

**IMMUNCYTOCHEMISCHE UND  
SCANNING - PHOTOMETRISCHE ANALYSE VON  
GLIOMEN DES MENSCHEN MITTELS  
MONOKLONALER ANTIKÖRPER**

**JANETTE GROENEVELD**

**~~1987~~**

Disbui. München

1988







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41546201\\_0016](https://archive.org/details/IA41546201_0016)

Aus dem Institut für Tierpathologie  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Aus dem Institut für Pathologie  
Abteilung für Klinische und Experimentelle Neuroonkologie  
Städtisches Krankenhaus Bogenhausen  
Akademisches Lehrkrankenhaus  
der Technischen Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Immuncytochemische und scanning-photometrische Analyse  
von Glomen des Menschen mittels monoklonaler Antikörper

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Janette Groeneveld  
aus Glückstadt

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Korreferent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Meinen Eltern gewidmet



# INHALTSÜBERSICHT

Seite

## A. EINLEITUNG

1

## B. LITERATURÜBERSICHT

2

### I. Charakterisierung gliomassoziierter Antigene mittels monoklonaler Antikörper

2

### II. Heterogenität neurogener Tumoren

3

### III. Quantitative Immuncytochemie

4

#### 1. Absorptionscytrophotometrie

4

#### 2. Mikrofluorometrie

5

## C. PROBLEMSTELLUNG

8

## D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

9

### I. Material und Methoden

9

#### 1. Hirntumoren

9

#### 2. Zellkulturen

9

##### 2.1. Primär- und Kurzzeitzellkulturen

9

##### 2.2. Langzeitkulturen

10

##### 2.3. Permanente Gliomzelllinien

10

#### 3. Cytospin-Präparationen

10

##### 3.1. Tumorzellsuspensionen

10

##### 3.2. Zellkulturen

11

#### 4. Monoklonale Antikörper

11

#### 5. Immuncytochemie

11

##### 5.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung

11

##### 5.2. Indirekte Immunfluoreszenz

12

#### 6. Präparation eines fluoreszierenden Referenzmaterials

13

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7. Absorptionscytrophotometrie                                                         | 14 |
| 7.1. Meßmethodik                                                                       | 14 |
| 7.1.1. Spektrale Farbstoffcharakteristik                                               | 14 |
| 7.1.2. Meßsystem                                                                       | 14 |
| 7.1.3. Software                                                                        | 15 |
| 7.1.4. Bestimmung des Meßfeldes                                                        | 15 |
| 7.1.5. Meßvorgang                                                                      | 15 |
| 7.1.5.1. Einzelzell-Scanning                                                           | 15 |
| 7.1.5.2. Mehrzellen-Scanning                                                           | 16 |
| 7.2. Auswertung absorptionsphotometrischer Daten                                       | 16 |
| 7.3. Histogramm                                                                        | 17 |
| 7.4. Rastergraphik                                                                     | 17 |
| 8. Mikrofluorometrie                                                                   | 18 |
| 8.1. Meßsystem                                                                         | 18 |
| 8.2. Meßvorgang                                                                        | 18 |
| 8.2.1. Einzelzell - und Mehrzellen-Scanning                                            | 18 |
| 8.2.2. Scanning des Referenzmaterials                                                  | 19 |
| 8.3. Bearbeitung der Rohmeßdaten                                                       | 19 |
| 8.4. Statistische Auswertung der integrierten<br>Scanningfelder pro Präparat           | 20 |
| 8.5. Zusammenstellung des Datenmaterials<br>und Ordnung nach bestimmten Kriterien      | 20 |
| 8.6. Statistische Auswertung durch zweiseitiges<br>Prüfverfahren nach Student (t-Test) | 21 |
| II. Ergebnisse                                                                         | 21 |
| A. Absorptionscytrophotometrie                                                         | 21 |
| 1. Quantifizierung zellgebundener Antikörper                                           | 21 |
| 2. Verteilungsmuster der Antikörperbindungsstellen                                     | 22 |
| B. Mikrofluorometrie                                                                   | 25 |
| 1. Einzelzell-Scanning                                                                 | 25 |
| 2. Mehrzellen-Scanning                                                                 | 25 |
| 2.1. Reproduzierbarkeit                                                                | 25 |
| 2.1.1. Prüfung auf Kurzzeitvariationen                                                 | 25 |

|                                                                                          |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.1.2. Prüfung auf Langzeitvariationen                                                   | 25     |
| 2.2. Scanning des Referenzmaterials                                                      | 26     |
| 3. Vergleich Innerhalb einzelner Gliomzelllinien                                         | 26     |
| 3.1. Erkennungsraten von monoklonalen Antikörpern<br>innerhalb einzelner Gliomzelllinien | 26     |
| 3.1.1. Kurzzeitkulturen                                                                  | 26     |
| 3.1.2. Langzeitkulturen                                                                  | 28     |
| 3.1.3. Permanente Gliomzelllinien                                                        | 28     |
| 3.2. Vergleich der Fluoreszenzintensitäten<br>Innerhalb einzelner Gliomzelllinien        | 29     |
| 4. Vergleich zwischen Gliomzelllinien                                                    | 32     |
| 4.1. Antikörperdefinierte Erkennungsraten zwischen<br>Gliomzelllinien                    | 32     |
| 4.2. Vergleich von Fluoreszenzintensitäten                                               | 32     |
| <br>E. DISKUSSION                                                                        | <br>34 |
| 1. Meßmethodik                                                                           | 34     |
| 1.1. Absorptionscytophotometrie                                                          | 34     |
| 1.2. Mikrofluorometrie                                                                   | 35     |
| 2. Immunocytochemische und cytophotometrische Analyse                                    | 37     |
| <br>F. ZUSAMMENFASSUNG                                                                   | <br>40 |
| <br>G. LITERATURVERZEICHNIS                                                              | <br>42 |



## A. EINLEITUNG

Tumorzelloberfläche und Antigenstruktur maligner Neoplasien des Nervensystems waren in den vergangenen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Es zeigte sich, daß an der Oberfläche von humanen (Coakham et al., 1980; Schnegg et al., 1981a; Wikstrand u. Bigner, 1982; De Mural et al., 1985) und experimentellen (Stavrou et al., 1983, 1984) Gliomzellen tumorassoziierte Antigene exprimiert werden.

Seit Einführung der Hybridomtechnologie durch Köhler und Milstein (1975) konnte mittels monoklonaler Antikörper mit definierter Spezifität das Antigenprofil neurogener Tumoren näher charakterisiert werden. Bislang durchgeführte Untersuchungen an verschiedenen Hirntumorsystemen unter Verwendung monoklonaler Antikörper zeigten, daß sowohl neurogene Tumoren des Menschen als auch experimentelle Hirntumoren hinsichtlich ihrer Antigenexpression heterogen sind (Stavrou et al., 1983). Diese Heterogenität ist für die Optimierung diagnostischer und möglicherweise immuntherapeutischer Verfahren von großer Bedeutung.

Die Immun Diagnostik hat durch die Anwendung monoklonaler Antikörper in Verbindung mit verschiedenen cytochemischen Nachweistechiken eine erhebliche Bereicherung ihrer methodischen Möglichkeiten erfahren. Direkte und indirekte Verfahren beruhen auf einer Sichtbarmachung der im Verlauf einer immunologischen Reaktion entstandenen Antigen-Antikörperkomplexe, wobei Antikörper mit absorbierenden oder fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden. Die Stärke der Farbreaktion gibt indirekt Aufschluß über den Grad spezifisch gebundener Antikörper und somit über die vorliegende Antigendichte.

Die subjektive Interpretation solcher cytochemischer Färbungen wird von subjektiven Faktoren beeinflusst, die häufig zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen (Bengtsson et al., 1976). Daher sind quantitative Meßverfahren notwendig, die eine genaue und objektive Darstellung von Menge und Verteilung spezifisch gebundener Antikörper erlauben (Ploem, 1980).

Die heute vorwiegend zur Analyse der Expression von Zellmembranantigenen eingesetzten Verfahren der Durchflußcytofluorometrie und des Radio-Immunoassay erlauben zwar eine Quantifizierung spezifisch gebundener Antikörper in kurzer Zeit und mit hoher Genauigkeit, sind jedoch mit einigen Nachteilen behaftet (Bjelkenkrantz et al., 1983; Nibbering et al., 1985). Informationen über Zellmorphologie und Verteilungsmuster spezifisch gebundener Antikörper an Einzelzellen gehen bei diesen Meßverfahren verloren, und wiederholte Messungen an einer Zellpopulation sind nicht möglich.

Die quantitative Cytologie an Objektträgerpräparationen hat erst seit einigen Jahren Eingang in die Tumordiagnostik gefunden (Hall u. Fu, 1985). Für Objektträgerpräparationen von Tumorzellen bieten sich statische cytophotometrische Scanningverfahren an, die je nach immunocytochemischer Färbetechnik auf dem Prinzip der Absorptionsphotometrie oder Fluorometrie beruhen.



## B. LITERATURÜBERSICHT

### I. Charakterisierung gliomassoziielter Antigene mittels monoklonaler Antikörper

Experimentelle Untersuchungen an verschiedenen Hirntumorsystemen haben gezeigt, daß neurogene Tumoren durch unterschiedlich ausgeprägte immunogene Eigenschaften gekennzeichnet sind (de Tribolet u. Carrel, 1980; Stavrou et al., 1982).

Bei der Aufklärung der immunologischen Eigenschaften von Gliomen stand der Nachweis der Expression gliomassoziielter Antigene als Ausdruck der malignen Transformation glialer Zelltypen im Vordergrund. Die Identifizierung, Charakterisierung und Isolierung von gliomassoziierten Antigenen mittels im xenogenen System gewonnenen polyklonalen Antisera erwies sich als schwierig, da sie mit einer großen Zahl unspezifischer Begleitantikörper verunreinigt waren, die durch aufwendige Absorptionsschritte entfernt werden mußten (Wikstrand et al., 1977; Wikstrand u. Bigner, 1979; Schnegg et al., 1981a).

Durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper mit definierter Spezifität und hoher Reinheit wurde eine detaillierte Beschreibung gliomassoziielter Antigene ermöglicht. So führte die Reaktivität monoklonaler Antikörper gegen verschiedene Tumoren des Menschen, wie Melanome (Koprowski et al., 1978; Steplewski et al., 1979; Yeh et al., 1979; Carrel et al., 1982; Dippold et al., 1980; Imal et al., 1981), Neuroblastome (Kennet u. Gilbert, 1979) und Gliome (Schnegg et al., 1981b; Cairncross et al., 1982) zur Beschreibung der Expression von Antigen determinanten in verschiedenen neurogenen Tumoren und in fetalem Hirngewebe. Der Einsatz monoklonaler Antikörper in der Analyse von Determinantengruppen der Tumorzellmembran sicherte bei spontanen (Bullard u. Bigner, 1985) und experimentellen Hirntumoren (Stavrou et al., 1980) das Vorkommen tumorassoziielter Antigene in verschiedenen Hirntumortypen.

Neben gliomassoziierten Antigenen wurde eine Gruppe von Differenzierungsantigenen beschrieben, die sich sowohl in neuroektodermalen Tumoren, als auch in fetalem Hirngewebe nachweisen lassen (Kennet u. Gilbert, 1979; de Tribolet u. Carrel, 1980; Seeger et al., 1981; Schnegg et al., 1981b; Carrel et al., 1982; Wikstrand u. Bigner, 1982; Coakham, 1984).

Bindungsstudien mit monoklonalen Antikörpern, die gegen humane HLA-DR-Oberflächenantigene gerichtet waren, ergaben spezifische Bindung mit einigen in vitro etablierten humanen Gliomzellen (Kim et al., 1985; Diserens et al., 1981; Kemshead, 1982; De Murali et al., 1985). Daraus wurde gefolgert, daß gemeinsame antigene Determinanten sowohl bei Hirnzellen als auch bei Zellen des lymphatischen Systems exprimiert werden.

## II. Heterogenität neurogener Tumoren

Das Vorkommen verschiedener Zellpopulationen im Tumorgewebe mit unterschiedlichen Eigenschaften ist in diagnostischer und therapeutischer Hinsicht von besonderer Bedeutung. Diese Heterogenität konnte bislang durch geno- und phenotypische Untersuchungen auch für neurogene Tumoren belegt werden.

Bei Gliomen des Menschen und den daraus etablierten Zellkulturen wurden genotypische Unterschiede festgestellt, die sich in Chromosomenzahl, Markerchromosomen (Shapiro et al., 1981a; Bigner et al., 1981; McComb et al., 1984; Shapiro u. Shapiro, 1985) sowie DNA-Gehalt (Mork et al., 1980) äußerten. Darüberhinaus wurde eine heterogene Erscheinungsform ethylnitrosoharnstoff-Induzierter Rattengliome durch einen unterschiedlichen DNA-Gehalt und eine veränderte Ploidie der Zellen in vivo und in vitro nachgewiesen (Laerum et al., 1983).

Eine phenotypische Heterogenität maligner Neoplasien des Hirns konnte für mehrere Kriterien begründet werden. Im Vergleich unterschieden sich Gliomzellen in vitro hinsichtlich der morphologischen Wachstumseigenschaften und der Expression biochemischer Differenzierungsmarker (Bigner et al., 1981; Poduslo et al., 1983; Schiffer et al., 1986; McKeever et al., 1987). Auch in Bezug auf die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika verhielten sich Tumorzellpopulationen unterschiedlich. So zeigten histologisch gleiche Hirntumoren des Menschen, die subcutan und intracerebral in immundefiziente Nacktmäuse transplantiert worden waren, gegenüber Nitrosoharnstoff-Derivaten und Procarbazin unterschiedliche Chemosensitivität (Bullard et al., 1981; Shapiro et al., 1981a; Schold u. Bigner, 1983). Mikrocytotoxizitätstests ließen eine unterschiedliche Wirkung von Bischlorethyl-Nitrosoharnstoff und cis-Diamindichlorplatin an Gliomzellen in vitro erkennen (Shapiro et al., 1981b; Yung et al., 1982).

Eine unterschiedliche Anzahl von Zellen chemisch induzierter Rattengliome zeigte keine Reaktivität mit polyklonalen Antisera (Stavrou et al., 1978). Ein ähnliches Ergebnis wurde durch Mikrocytotoxizitätstests mit sensibilisierten T-Zellen erzielt (Bilzer et al., 1982). Bindungsstudien mit monoklonalen Antikörpern deuteten auf Unterschiede in der Expression gliomassoziierter Antigene hin. Untersuchungen an syngeneten Rattengliomen haben ergeben, daß mit Hilfe von indirekten Immunfluoreszenztests nur ein Teil der Zellen positiv reagierte (Stavrou et al., 1983). Dieses Ergebnis konnte ferner durch Cytotoxizitätstests unter Verwendung monoklonaler Antikörper und Komplement bestätigt werden (Yeh et al., 1981; Stavrou et al., 1984).

In einer Untersuchung über antigene Heterogenität von Gliomzellen wiesen Wikstrand et al. (1983) mittels monoklonaler Antikörper unter Verwendung immunhistologischer Methoden bei einer Gliomkultur des Menschen und den daraus etablierten Klonen heterogene Subpopulationen nach. Ein variables Antigenprofil zwischen Gliomzellpopulationen wurde durch immunocytochemische Bindungsstudien und einer Reihe monoklonaler Antikörper dargestellt (Stavrou et al., 1987). Inwieweit die Tumorerheterogenität auf einer phenotypischen Eigenschaft beruht oder als Ausdruck genotypischer Variabilität durch steigende Mutationsraten von Tumorzellpopulationen angesehen werden muß, wird zur Zeit von vielen Autoren diskutiert (Bigner et al., 1981; Nowell, 1978; Wikstrand et al., 1985; Kendal u. Frost, 1986). Unterschiedliche Zellzyklusphasen und epigenetische Faktoren induzieren offensichtlich die Erzeugung phänotypischer Varianten innerhalb eines

Tumors (Nowell, 1976; Frost u. Kerbel, 1983; Olsson, 1986). Die Existenz verschiedener Klone im Tumorgewebe mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften sowie die Interaktionen zwischen verschiedenen Tumorzellpopulationen und deren Einfluß auf Gleichgewichtszustände sind für das Verständnis der Tumorentwicklung von großer Bedeutung (Poste u. Greig, 1983; Woodruff, 1983).

### III. Quantitative Immuncytochemie

#### 1. Absorptionscytophotometrie

Für die qualitative und quantitative Analyse tumorassoziierter Antigene sind zahlreiche cytochemische Färbemethoden entwickelt worden, in denen fluorchrom-, radioisotop-, oder enzymmarkierte Antikörper zum Einsatz kommen. Die Enzymantikörpertechnik hat seit ihrer Einführung durch Nakane und Pierce (1967) verbreitet Anwendung gefunden. Sie beruht auf einer immunologischen Reaktion durch Formierung eines Antigen-Antikörper-Komplexes, der durch eine cytochemische Enzymreaktion unter Verwendung spezieller Substrate licht- und elektronenmikroskopisch nachgewiesen wird (De Jong et al., 1985). Als Substrate werden überwiegend 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Graham u. Karnovsky, 1966) und 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC, Graham et al., 1965) verwendet, wobei das Reaktionsprodukt mit AEC über eine größere Stabilität verfügt. Das Problem der qualitativen und quantitativen Beurteilung cytochemischer Färbungen im Hinblick auf die Charakterisierung von Tumorzellen liegt darin, daß diese subjektiv ist und damit zahlreichen Fehlern unterliegt (Bengtsson et al., 1976).

Zu einer objektiven und quantitativen Interpretation solcher Färbungen könnte die Cytophotometrie beitragen, die erst in den letzten Jahren Eingang in die Tumordiagnostik gefunden hat (Hall u. Fu, 1985). Dieses Meßverfahren beruht auf der Messung der Intensitätsabnahme eines Strahlenbündels durch ein absorbierendes Medium, zum Beispiel durch natürlich vorhandene oder elektiv angefärbte Zellbestandteile. Die Anforderungen an die Meßgenauigkeit in der quantitativen Cytochemie motivierte die Entwicklung aufwendiger Instrumente, die vorwiegend in der quantitativen Analyse von Tumorzell-DNS eingesetzt wurden (Ploem et al., 1974; Melamed u. Kamensky, 1975; Van Duijn, 1976; Van der Ploeg et al., 1977). Die Einführung der Computertechnik und die Entwicklung für spezielle Fragestellungen angepaßter Programme hat die methodischen Möglichkeiten in der quantitativen Cytochemie wesentlich erweitert (Holmquist et al., 1977; Rasch u. Rasch, 1979; Ploem, 1980; Bjelkenkrantz et al., 1981; Donovan u. Goldstein, 1985).

Die Genauigkeit der photometrischen Analyse von immuncytochemisch gefärbtem Tumormaterial ist abhängig von mehreren grundlegenden Voraussetzungen:

1) Das Prinzip der Absorptionscytophotometrie basiert auf der Proportionalität zwischen der Extinktion, dem Logarithmus der Absorption, und der Konzentration an absorbierendem Farbstoff,

wie es das sogenannte Lambert-Beer'sche Gesetz verlangt. Das gilt darüberhinaus nur für eine homogene Verteilung der lichtabsorbierenden Substanz innerhalb eines Meßfeldes (Piller, 1977). Diese Bedingung ist bei inhomogen gefärbten biologischen Präparaten nicht erfüllt (Zimmer, 1973). Um diesen sogenannten Inhomogenitätsfehler zu vermeiden, wurde die Scanning-Methode in die Mikroskopie eingeführt. Durch kleine Meßblenden, in denen das Meßfeld homogen erscheint, wird das Objekt durch automatische Feinbewegung eines Objektträgers rasterförmig abgetastet, ein Verfahren, das vor allem durch Caspersson (1936) bekannt wurde. Danach ergibt die Summe aller Meßwerte die Gesamtabsorption des Präparates (Fukuda et al., 1978).

2) Die Indirekte Quantifizierung von gebundenen Antikörpern bzw. von Antigenen in immunocytochemisch gefärbten Präparaten ist durch die photometrische Messung der umgesetzten Farbstoffmenge bis zu einem gewissen Grad möglich (Streefkerk u. van der Ploeg, 1973). Zwischen der Peroxidase-Aktivität enzymgekoppelter Antikörper und der spektrophotometrisch bestimmten umgesetzten Menge 3-Amino-9-Ethylcarbazol besteht eine lineare Beziehung.

Eine stöchiometrische Beziehung zwischen den immunologischen Reaktionspartnern besteht nur, wenn diese in einem äquivalenten Verhältnis miteinander reagieren. Diese komplexen Zusammenhänge sind an Modellsystemen aus proteinkonjugierten Agarose-Partikeln eingehend untersucht worden (Streefkerk et al., 1975).

3) Jede quantitative Analyse hängt von der Zuverlässigkeit der immunocytochemischen Methode ab, die durch zahlreiche Faktoren definiert wird (Petrusz, 1983).

Die Spezifität immunocytochemischer Methoden wurde seit der Einführung monoklonaler Antikörper wesentlich gesteigert.

Die quantitative Analyse gliomassoziierten Antigens mittels monoklonaler Antikörper und indirekter Immunperoxidasereaktion durch photometrische Auswertung des Reaktionsproduktes erscheint seit den Untersuchungen von Nibbering et al. (1985) möglich. Er entwickelte eine Methode, um die Bindung monoklonaler Antikörper an Peritonealmakrophagen durch Cytophotometrie von Einzelzellen zu quantifizieren. Dabei wurde das Reaktionsprodukt aus einer indirekten Immunperoxidase-Reaktion mit Diaminobenzidin als Substrat gemessen und damit die Menge gebundener Antikörper photometrisch bestimmt.

## 2. Mikrofluorometrie

Aufgrund der hohen Sensitivität hat die Erkennung von Zelloberflächenantigenen mittels fluorochrom-markierter Antikörper seit ihrer Einführung durch Coons et al. (1941) und Coons u. Kaplan (1950) ein breites Anwendungsspektrum in der immunocytochemie gefunden.

Das Bestreben, die mikroskopische Auswertung von Färbereisultaten zu objektivieren und zu quantifizieren, stimulierte in den 60er Jahren die Entwicklung der Fluorometrie. Mehrere Aspekte der photometrischen Quantifizierung der Fluoreszenz nach Markierung zelleigener Antigene mit-

tels fluoreszierender Antikörper wurden bereits beschrieben (Goldman u. Carver, 1961; Mansberg u. Kusnetz, 1966; Goldman, 1967; Nalrn, 1968).

Eine mehr oder weniger automatisierte Auswertung ermöglichten computergesteuerte Scanning-Verfahren, die vornehmlich zur Messung zellulärer DNS eingesetzt wurden (Böhm u. Sprenger, 1968; Ploem et al., 1974; Cowell u. Franks, 1980; Fukuda, 1983; Ashihara et al., 1986). Da sie sich als zeitaufwendig und mühsam erwiesen, wurde seither die von Dittrich und Göhde (1969) entwickelte und von Bonner et al. (1972) in die Immunologie eingeführte Durchflußcytofluorometrie vorwiegend zur Analyse der Expression von Zellmembranantigenen eingesetzt. Diese Methode ist jedoch mit Nachteilen behaftet, wie sie bei der Untersuchung über die Tumorproliferation durch cytophotometrische Quantifizierung zellulärer DNS in Objektträgerpräparationen beschrieben wurden (Bjelkenkrantz et al., 1981).

Die Methodik der Cytofluorometrie wurde von Ruch (1970) und Ruch u. Leeman (1973) ausführlich dargestellt, die dieser Technik im Vergleich zur Absorptionsphotometrie eine 100fach höhere Sensitivität zuschrieben.

Im Gegensatz zur Absorptionscytophotometrie wird nicht die Intensitätsabnahme des durch ein Objekt hindurchtretenden Lichtstromes, sondern das als Fluoreszenz emittierte Licht gemessen. Photometrisch gesehen besteht kein Inhomogenitätsfehler, so daß durch eine einzige Messung der Gesamtfarbstoffgehalt eines inhomogenen Objektes erfaßt werden kann (Böhm u. Sprenger, 1968).

Die Proportionalität zwischen Intensität der emittierten Fluoreszenz und der Menge fluoreszierender Substanz ist im Hinblick auf die quantitative Erfassung fluoreszierender Antigen-Antikörperkomplexe von besonderer Bedeutung. Fehlerquellen, wie Innerer Filtereffekt, Reabsorption, Auslöschphänomen und das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes sind eingehend beschrieben (Prenna et al., 1974; James, 1983) und bedingen eine teilweise Nichtlinearität zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration fluoreszierender Substanz (Böhm et al., 1968).

Der Effekt des Ausbleichens ("*fading*") gefärbter Präparate nach Exposition fluoreszenzanregender Strahlung war ein Hauptproblem der Fluoreszenz und erschwerte die quantitative Auswertung und die fotografische Dokumentation. Das Ausmaß des Ausbleichens ist abhängig von der Art des Fluorochroms und der Fluoreszenzintensität (Storz, 1982).

Durch Aufsuchen der Objekte im Phasenkontrast oder Dunkelfeld und mit kurzen Anregungszeiten im msec-Bereich (Enerbäck u. Johansson, 1973) sowie mittels einer Vorbestrahlungsmethode (Fukuda et al., 1979; Fukuda et al., 1982; Storz, 1982) versuchten einige Autoren diese Photodekomposition zu verhindern.

Warweg und Körting (1981) analysierten den Einfluß des pH-Wertes im Einbettungsmittel FITC-markierter Präparationen auf die photometrische Meßwertablesung. Durch Zusatz von p-Phenyldiamin zum Einbettungsmittel stellten Johnson und Araujo (1981) und Johnson et al. (1982) nach konstanter Lichtexposition ein nur minimales Ausbleichen ihrer Präparationen nach 20 Minuten fest. Nach 90 Minuten war ein Absinken der Anfangsintensität um 30 Prozent zu verzeichnen (Storz u. Jelke, 1984).

Nach Kawamura u. Aoyama (1983) ist eine absolute Quantifizierung abhängig von der Standardisierung der mikroskopischen Ausrüstung, sowie fluoreszierender Reagenzien und von präparativen Techniken.

Da Fluoreszenzintensitäten nicht als absolute Einheiten gemessen werden können, müssen sie in Relation zu einem Standard gesetzt werden, der zur Kalibrierung des optischen Systems und als Referenzwert für Immunfluoreszenz-Präparationen dienen soll (Ploem, 1982).

Biologische Objekte sind aufgrund qualitativer und quantitativer Unterschiede in ihrem Fluoreszenzmuster nicht konstant und daher als Referenzmaterial für manche Messungen ungeeignet. Bei der Analyse von Antigenstrukturen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper führt eine unterschiedliche Antigenexpression und Antikörperavidität zu einem heterogenen Fluoreszenzmuster, das für eine exakte Quantifizierung nicht geeignet ist (Holborow et al., 1982). Jongasma et al. (1971) und Knapp (1982) schlagen Referenzpräparationen vor, deren Fluoreszenzsignale quantitativ vergleichbar sind mit denen von Zellen, die mit Fluorescein (FITC)-markierten Antikörpern spezifisch gefärbt sind.

Eine wichtige Voraussetzung für quantitative Immunfluoreszenzmethoden ist weiterhin die Verwendung von Antikörpern mit hoher Spezifität und Homogenität, die durch die Einführung monoklonaler Antikörper möglich geworden ist. Es wird davon ausgegangen, daß die durchschnittlich gemessene Fluoreszenzintensität in einer linearen Beziehung zur Menge gebundener Antikörpermoleküle steht (Poncelet u. Carayon, 1985). Die Ausweitung auf die Messung der Antigenexpression setzt natürlich eine monovalente Antigen-Antikörperbindung voraus (Schauenstein u. Wick, 1982).

### C. PROBLEMSTELLUNG

Obgleich auf die allgemeine geno- und phenotypische Heterogenität von Hirntumoren des Menschen wiederholt hingewiesen wurde (Bigner et al., 1981; Wikstrand et al., 1983), liegen bislang keine verbindlichen Angaben über die Variation der Antigenexpression innerhalb und zwischen verschiedenen Gliomzellpopulationen vor.

Unter Verwendung monoklonaler Antikörper ergibt sich die Möglichkeit, unterschiedliche Subpopulationen innerhalb eines Tumors aufgrund spezifischer Oberflächendeterminanten zu unterscheiden.

Durch Blindungstudien mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern soll das Antigenprofil verschiedener in vitro propagierter Gliomzelllinien des Menschen dargestellt und verglichen werden. Die Immunocytochemische Markierung der durch monoklonale Antikörper definierten Oberflächenantigene erfolgt mittels indirekter Immunfluoreszenz- bzw. Immunperoxidasefärbung. Durch die Erarbeitung eines Meßverfahrens, das auf computerunterstützter Scanning-Cytophotometrie beruht, sollen Menge und Verteilung spezifisch gebundener Antikörper sowie der Anteil immunreaktiver Tumorzellen erfaßt werden. Es werden hierdurch objektive Aussagen über die Variation in der Antigenexpression zwischen und innerhalb verschiedener Gliomzelllinien erwartet. Darüberhinaus soll die Abhängigkeit der Antigenexpression von verschiedenen Zellpassagestadien geprüft werden.

## D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### I. Material und Methoden

#### 1. Hirntumoren

Es wurden 15 Fälle von Hirntumoren des Menschen untersucht, die nach den WHO-Richtlinien wie folgt klassifiziert wurden:

| Tumor-Nr. | Diagnose             | Bezeichnung der Zellkultur |
|-----------|----------------------|----------------------------|
| N59/85    | Glioblastom-Sarkom   | 85HG-59                    |
| N63/85    | Astrocytom II        | 85HG-63                    |
| N64/85    | Glioblastom          | 85HG-64                    |
| N65/85    | Glioblastom          | 85HG-65                    |
| N66/85    | Astrocytom III       | 85HG-66                    |
| N66-T6    | Astrocytom III       | 86HG-66-T6                 |
| N39/86    | Glioblastom          | 86HG-39                    |
| N28/87    | Glioblastom          | 87HG-28                    |
| N29/87    | Astrocytom II        | 87HG-29                    |
| N30/87    | Oligodendrogliom II  | 87HG-30                    |
| N31/87    | Astrocytom III       | 87HG-31                    |
| N35/87    | Astrocytom III       | 87HG-35                    |
| N36/87    | Astrocytom III       |                            |
| N37/87    | Glioblastom          | 87HG-37                    |
| N39/87    | Oligodendrogliom III |                            |

Das biptisch bzw. operativ gewonnene Material stammte aus der Abteilung für Neurochirurgie (Chefarzt: Dr. med. F. Schmidberger) des Klinikums München Bogenhausen.

### 2. Zellkulturen

#### 2.1. Primär- und Kurzzeitkulturen

Für die Etablierung von Zellkulturen wurden geeignete Gewebstücke unter sterilen Bedingungen und nach der mechanischen Gewebedissoziationsmethode (Paul, 1980) bzw. der Explantationsmethode in 50 ml NUNC-Plastikflaschen explantiert. Nach Zusatz von Nährmedium (M 199

mit Hank's Salzen, Seromed, Berlin), das pro Liter 20 % fetales bovines Serum (FBS, Flow laboratories, Meckenheim), 100000 I.E. Penicillin G, 0,1 g Amphotericin, 0,1 g Streptomycin und 3,4 ml 20 mM Glutamin enthielt, wurden die Zellen im offenen System bei 37°C , 6 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchte bebrütet. Nach Anwachsen und Vermehrung der Zellen wurde der Gehalt an FBS auf 10 % reduziert und Medium 199 durch RPMI-Medium (RPMI-1640, Flow Laboratories, Meckenheim) ersetzt.

Die in vitro-Passage von Primär- und Kurzzeitkulturen erfolgte durch Teilung im Verhältnis 1:2 bis 1:3 unter Verwendung einer STV-Lösung (100 ml Saline 10fach, 25 ml 25 %ige Trypsinlösung, 50 ml 1%ige Versene-Lösung, Aqua bidest ad 1000 ml).

## 2.2. Permanente Gliomzelllinien

Für die experimentelle Prüfung der Meßmethoden dienten permanente Zelllinien menschlicher Glome als Modell. Es wurden zu diesem Zweck die Gliomzelllinien 85HG-59, 85HG-63, 85 HG-64, 85HG-65, 85HG-66 und 86HG-66-T8 verwendet. Permanente Gliomzellen wurden in 250 ml NUNC-Plastikflaschen bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> im offenen System bei hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Nährmedium diente HC-Medium, das aus 450 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Karlsruhe) , 50 ml NCTC-135- Medium (Gibco), 75 ml FBS (Flow Laboratories, Meckenheim), 5 ml Natrium-Pyruvat und 0,1 g Neomycin bestand. Subkonfluente Kulturen wurden im Verhältnis 1:3 bis 1:10 unter Verwendung einer STV-Lösung geteilt.

## 3. Cytospin-Präparationen

Cytophotometrische Messungen haben zur Voraussetzung, daß die zu messenden Zellen vollständig isoliert im Präparat vorliegen.

### 3.1. Tumorzellsuspensionen

Für die Präparation morphologisch vollständig erhaltener Zellen zur Immunfärbung und anschließender cytophotometrischer Auswertung wurden frisches Tumormaterial, Zellkulturen sowie permanente Gliomzelllinien verwendet. Ein kleines Tumorgewebsstück wurde nach der modifizierten Methode von Allison et al. (1981) unter Verwendung von RPMI-1640 -Medium (Flow Laboratories, Meckenheim) zu einer Suspension aufbereitet und diese 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde anschließend in RPMI-1640 Medium unter Zusatz von 50% STV-Lösung und 1% bovinem Serumalbumin (BSA 22%, Merz und Dade, Düringen, Schweiz) 30 min bei 37°C im geschlossenen System inkubiert. Aliquots dieser Suspension (100 µl) wurden 5 min bei 500 rpm (SHANDON Cytoentrifuge) auf Objektträger zentrifugiert.

### 3.2. Zellkulturen

In Kultur wachsende konfluente Gliomzellen wurden mittels STV-Lösung vom Kulturgefäß abgelöst, in RPMI- 1640- Medium (Flow Laborataories, Meckenheim) gründlich suspendiert und anschließend auf eine Konzentration von 0,5 bis 1,0 Mio Zellen/ml Medium mit 1% bovinem Serumalbumin (Merz und Dade, Düdingen, Schwelz) eingestellt. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min bei 37°C im geschlossenen System wurden 100 µl dieser Zellsuspension 5 min bei 500 rpm auf Objektträger zentrifugiert (SHANDON Cytoцентриfuge). Die Präparate wurden über Nacht in staubfreier Umgebung luftgetrocknet und wurden in nativem bzw. fixiertem (4 min in 4°C kaltem Methanol/Aceton) Zustand bei - 20°C aufbewahrt (Ghosh et al., 1983).

### 4. Monoklonale Antikörper

Die zur Immuncytochemischen Analyse in vitro etablierter Gliome verwendeten monoklonalen Antikörper stammten aus der Fusion von Mausmyelomzellen (X63-Ag 8.653) und Spleenocyten von Balb/c -Mäusen, die mit Astrocytomzellen (85HG-22 bzw. 85HG-63) hyperimmunisiert worden waren. Die verwendeten Hybridomkulturüberstände (MUC 8-22, MUC 14-22 und MUC 2-63) wurden bereits charakterisiert (Stavrou et al., 1987).

Dabei handelte es sich bei MUC 8-22 und MUC 14-22 um IgG2a und bei MUC 2-63 um IgG1 Isotyp. Zusätzlich wurde ein monoklonaler Antikörper mit Spezifität für humane HLA -Klasse I - Oberflächenantigene verwendet.

### 5. Immuncytochemie

#### 5.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung

Die Immuncytochemische Darstellung der Antigen-Antikörperbindung wurde mit Hilfe der Indirekten Immunperoxidasefärbung nach den Angaben von Clocca u. Bjercke (1986) in modifizierter Form durchgeführt. Native und fixierte Zellpräparationen wurden 20 min bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 30 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in absolutem Methanol (1:40) zur Inaktivierung von endogener Peroxidase inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-A für jeweils 10 min wurden durch eine Einwirkung von 10%igem normalen Kaninchenserum (Sigma, Delsenhofen) in PBS-A während 30 min bei Raumtemperatur unspezifische Antikörperbindungen blockiert. Nach vorsichtigem Absaugen überschüssigen Serums wurden die Präparate 2 Stunden lang mit 50 µl nativem Hybridomüberstand bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mittels PBS-A 4 mal jeweils 10 min gewaschen. Als zweiter Antikörper diente ein mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Kaninchen-anti-Maus IgG (Dakopatts, Kopenhagen,

Dänemark). Dieser wurde 1:100 in PBS-A unter Zusatz von 1% Normalserum vom Kaninchen (Sigma, Deisenhofen) verdünnt, und die Präparate wurden mit 50 µl dieser Verdünnung eine Stunde bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre inkubiert. Im Anschluß an einen erneuten Waschvorgang von 5 min mit PBS-A wurden die Antigen-Antikörperbindungsstellen durch ein Substrat folgender Zusammensetzung sichtbar gemacht : 3 mg 3-amino-9-ethyl-Carbazole (AEC, Sigma, Deisenhofen) wurden in 1,2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva, Heidelberg) gelöst und in 30 ml 0.1 M Barbitalspuffer aufgenommen. Das Filtrat dieser Lösung wurde kurz vor Gebrauch mit 20 µl 30 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol, Merck, Darmstadt) versetzt. Nach einer Einwirkungszeit von 30 min wurde die Farbreaktion durch Abspülen mit Aqua dest. abgebrochen und die Objektträger mit Kaiser's Glyceringelatine eingeschlossen und mit Klarsichtlack versiegelt.

Um eine unspezifische Bindung an Tumorzellen auszuschließen, wurde in jedem Färbexperiment eine Negativ-Kontrolle eingeschlossen. In diesem Fall wurde der erste Antikörper durch normales Mausserum (Sigma, Deisenhofen) in einer Verdünnung von 1:10 (PBS-A) ersetzt.

## 5.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Als äquivalente Nachweismethode für Antigen-Antikörperkomplexe wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Technik eingesetzt.

Cytospin-Präparationen wurden 15 Minuten in PBS-A vorgewaschen, bevor sie mit jeweils 50 µl unverdünntem Hybridomüberstand 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen von je 5 min Dauer in PBS-A wurden die Präparate mit 50 µl eines Fluoresceinisothiocyanat-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulins (Dakopatts, Kopenhagen, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:10 in PBS-A, entsprechend einer im Vorversuch erstellten Verdünnungsreihe, in gleicher Weise inkubiert.

Im Anschluß an einen Waschvorgang von 10 min folgte die Kernfärbung nach Ockleford et al.(1981). Zu diesem Zweck wurden 5 mg Propidiumjodid (Sigma, Deisenhofen) in 100 ml 0,1 %igem Trinatriumzitrat gelöst. Diese Stammlösung ist lichtgeschützt bei 4°C mehrere Monate haltbar und wurde vor Gebrauch 1:3 (PBS-A) verdünnt. Auf jeden Objektträger wurde davon ein Tropfen gegeben, der 5 min bei 4°C einwirkte. Nach 2 Waschschritten von jeweils 20 min (PBS-A) wurden die Präparate zur Verminderung des Ausbleichens in einem Einbettungsmittel nach Johnson u. Araujo (1981) eingeschlossen. 10 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH7,4), die 100 mg p- Phenylendiamin (Sigma, Deisenhofen) enthielt, wurde zu 90 ml Glycerol (Merck, Darmstadt) gegeben und anschließend der pH-Wert auf 8,0 unter Verwendung eines 0,5 M Carbonat-Bicarbonat-Puffers (pH 9,0) eingestellt. Dieses Medium ist in einer dunklen Flasche bei -20°C haltbar.

Um eine unspezifische Fluoreszenz durch unspezifische Antikörperbindung auszuschließen, wurde eine Negativ-Kontrolle, wie in Abschnitt 5.1. beschrieben, mitgeführt.

## 6. Präparation eines fluoreszierenden Referenzmaterials

Da Fluoreszenzintensitäten nicht als absolute Einheiten gemessen werden können und ein Leerwert wie in der Absorptionsspektrophotometrie in der Fluorometrie nicht existiert, sollte ein homogen fluoreszierendes Vergleichspräparat in jedem Färbeexperiment mit eingeschlossen sein, um den für die Messung benötigten Bereich später einstellen zu können.

Das üblicherweise zur Elchung verwendete Uranylglass stand nicht zur Verfügung und ist auch nicht mehr im Handel.

Für die folgenden Untersuchungen wurde zur Herstellung eines Referenzobjektes für fluoreszierende Zellpräparationen eine definierte Menge Fluoresceinisothiocyanat (FITC) an eine künstliche Matrix gekoppelt. Diese Menge wurde aus Verdünnungsreihen ermittelt, so daß die Fluoreszenzintensität in dem Bereich spezifisch fluoreszierender Zellen lag.

Die Präparation erfolgte nach der Methode von Haalman u. van Dalen (1974) in abgewandelter Form und Anwendung.

Sephadex-Partikel (Sephadex G-25-50, Sigma, Deisenhofen) wurden in 2 M NaOH suspendiert und 3 Stunden lang gequollen. Die gequollene Suspension wurde anschließend in einem graduieren Zentrifugenröhrchen 1 min lang bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zum verbleibenden Volumen sedimentierter Sepharosepartikel wurde die vierfache Menge einer neutralisierten Aminoethylschwefelsäure (100 mg 2-Aminoethyl-Hydrogensulfat (Aldrich, Steinhelm) pro ml 2 M NaOH) gegeben. Die Kopplungsreaktion von Sephadex-Partikeln mit Aminogruppen wurde durch Erhitzen dieser Lösung auf 85°C während 2 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die Mischung in einen Trichter mit Filterpapier aus Glasmikrolaser (GF/C, Whatman LTD, Maidstone, England) übernommen und zuerst mit 2 M NaOH, dann mit Aqua dest. und zum Schluß mit 0,05 M Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,5) gewaschen. Danach wurden die Aminoethyl-Sephadexpartikel mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Serva, Heidelberg) derivatisiert, das in einer Verdünnung von 0,1 mg FITC pro 100 ml Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,5) verwendet wurde. 10 ml dieser frisch angesetzten Fluorochromlösung wurden mit 1 ml Sephadex-Partikeln 3 Stunden unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Die derivatisierten Partikel wurden danach unter Verwendung von Filterpapier aus Glasmikrolaser zunächst 3 mal mit je 15 ml Natriumcarbonat-Puffer und danach gleichermaßen mit PBS-A gewaschen. Die Partikel wurden vom Filterpapier abgeschwemmt und in einem kleinen Glasgefäß über Nacht in PBS-A gewässert. Da die Größe der gequollenen, gefärbten Sephadex-Partikel variierte, wurden nur die kleinsten Partikel mit einem Durchmesser von ca. 30 bis 50 µm - entsprechend der Größe der zu messenden Zellen - durch Fraktionierung unter Sedimentation der schwereren Partikel in PBS-A heraussortiert. Der nicht sedimentierte Teil, der die leichten kleineren Partikel enthielt, wurde nach 15 min Sedimentationsdauer verworfen. Aliquots (100 µl) der einfach fraktionierten Suspension wurden mit einem Tropfen bovinem Serumalbumin (Merz und Dade, Dödingen, Schweiz) zur besseren Haftung 5 min bei 500 rpm auf Objektträger zentrifugiert (SHANDON Cytozentrifuge). Nach Lufttrocknung unter Lichtabschluß konnten diese Referenzpräparate bei - 20°C gelagert und bei

Bedarf - mit Einbettungsmittel nach Johnson und Araujo (1981) eingeschlossen - die Fluoreszenzintensität der Partikel gemessen werden.

## 7. Absorptionscytrophotometrie

### 7.1. Meßmethodik

#### 7.1.1. Spektrale Farbstoffcharakteristik

Um die Menge des Reaktionsproduktes aus Peroxidase-konjugierten Antikörpern und 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) quantitativ zu bestimmen, wurde die Absorption des rotbraunen Farbproduktes bei einer Wellenlänge gemessen, bei der die Extinktion proportional zur Menge des oxidierten Farbstoffes ist. Zu diesem Zweck mußte der Wellenlängenbereich der maximalen Absorption bekannt sein, da nur in einem engen Spektralbereich die Lichtabsorption mit der Menge eines Farbstoffes, in diesem Fall der Menge adsorbierten Farbstoffes an der Zelloberfläche, korreliert.

Das Transmissionsspektrum gefärbter und ungefärbter Zellen wurde direkt aus dem Präparat aufgenommen. Die ungefärbte, d.h. nicht immunreaktive Zelle im Objekt diente als photometrischer Standard. Die an verschiedenen Stellen des Präparates gemessenen Lichtintensitäten wurden mittels Monochromator in ein Spektrum zerlegt, das anschließend mit Hilfe der Software LAMBDA-Scan (Carl Zeiss, Oberkochen) verarbeitet wurde.

Oxidiertes AEC an der Zelle zeigte ein deutliches Absorptionsplateau im Spektralbereich von 450 bis 550 nm und war daher für die Wahl des geeigneten Spektralbereichs unempfindlich. Quantitative Messungen wurden bei 480 nm vorgenommen, da bei dieser Wellenlänge die mikroskopischen Kontraste subjektiv besonders deutlich erschienen.

#### 7.1.2 Meßsystem

Absorptionsmessungen an Cytosplin-Präparaten wurden durchgeführt an einem Universal-Mikroskop-Spektralphotometer UMSP 50 für Durchlicht bei 40facher oder 100facher Vergrößerung und Ultrakondensor mit einer numerischen Apertur von 0,8 (Carl Zeiss, Oberkochen). Das Mikroskop verfügte über einen Photometeraufsatz und ein Schnellscanningtisch von 0,25 µm minimaler Schrittweite, der mit einem "Joystick" manuell gesteuert werden konnte (x/y-Position). Die elektronische Peripherie umfasste Messverstärker MPC 64, Tischsteuerung ("Joystick"), Computer, Drucker, sowie Plotter (HP 9871). Die Messwerterfassung erfolgte über den Computer HP 310 mit 1 MByte RAM Speicherkapazität. Die Datenübertragung zwischen Peripheriegeräten und Computer wurde über eine IEC-Busschnittstelle realisiert. Als Beleuchtungseinheit für photometrische Messungen diente eine stabilisierte Halogen-Lampe HBO 100/1,5 V. Die Lichttransmission wurde in Abhängigkeit von der Meßfeldgröße in computergesteuerten Intervallen von 0,25 µm bis 0,75

$\mu\text{m}$  mit einer runden Meßfeldblende von 0,8 mm Durchmesser bei konstanter Wellenlänge von 482 nm durch einen Verlauffiltermonochromator VLF und bei optimaler Zuordnung von Ultrakondensor und Objektiv über den Photomultiplierkopf registriert.

### 7.1.3. "Software"

1. LAMBDA-Scan: Dieses Programm diente der Verarbeitung der vom Monochromator spektral zerlegten und gemessenen Lichtintensitäten einer ausgewählten Objektstelle. Die Meßwerte konnten als Transmissions- oder Extinktionswerte graphisch dargestellt und geplottet werden.

2. APAMOS: Das Programm "Automatische Photometrische Analyse Mikroskopischer Objekte durch Scanning" steuerte die Meßvorrichtungen, um ein Objektfeld photometrisch zu erfassen. Die Position einzelner Zellen auf dem Objektträger konnte gespeichert und später programmgesteuert aufgesucht werden, so daß wiederholte Messungen an der selben Zelle möglich waren. Die Meßwerte wurden mit Hilfe des Programms statistisch aufgearbeitet, nach ihrer geometrischen Verteilung im gescannten Objektfeld ausgedruckt und konnten als Histogramm des Meßfeldes dargestellt werden.

### 7.1.4. Bestimmung des Meßfeldes

Da der Rechner HP 310 maximal 30.000 Meßpunkte ("Pixel") pro Meßfeld verarbeitete, konnte das Meßfeld nicht beliebig groß gewählt werden. Um ein Meßfeld, das mehrere Zellen enthielt, scannen zu können, mußte mit höherer Schrittweite gefahren werden, d.h. der Sprung von Scanningpunkt zu Scanningpunkt wurde größer.

### 7.1.5. Meßvorgang

#### 7.1.5.1. Einzelzell-Scanning

Es wurde ein Meßbereich von 5 bis 95% ("Thresholds") vorgewählt. Von allen transmittierten Lichtintensitäten wurde nur der Anteil registriert, dessen Transmission zwischen den genannten Werten lag. Auf diese Weise blieb die durch unspezifische Farbstoffablagerung verursachte Hintergrundaktivität unberücksichtigt. Über das zu scannende Präparat wurde ein virtuelles Quadrat gelegt, das in 16 kleinere Quadrate mit 200  $\mu\text{m}$  Kantenlänge aufgeteilt wurde. Ihre Koordinaten wurden als fixes Meßraster in den Computer eingespeichert. Um jeden subjektiven Einfluß in der Auswahl der zu scannenden Zellen auszuschließen, wurden sie nach einem Zufallsprogramm bestimmt. In jedem der 16 kleinen Quadrate wurde diejenige Zelle ausgewählt, die dem Mittelpunkt des Objektfeldes - gekennzeichnet durch die Lage der Meßfeldblende- am nächsten lag.

Anschließend wurde sie mit Hilfe des "Joysticks" so umfahren, daß sie innerhalb eines virtuellen Rechtecks von 30 mal 34  $\mu\text{m}$  lag. Die Koordinaten aller Meßfelder wurden markiert und mit Beginn des Meßvorgangs - nach Abgleich einer leeren Objektstelle auf 100 % Transmission - vom Computer gesteuert automatisch aufgesucht und zellenweise abgetastet. Die Schrittweite in x und y-Richtung betrug dabei 0,5  $\mu\text{m}$ . Nach dem Scannen eines Meßfeldes wurde erneut fokussiert. Nachdem 16 Einzelzellen gescannt und ihre Daten vom Rechner gespeichert worden waren, wurde der Meßvorgang nach demselben Muster in einem analogen Bereich des Präparates wiederholt, so daß insgesamt Daten von 32 Zellen in einem Zeitaufwand von ca. einer Stunde ausgewertet werden konnten.

#### 7.1.5.2 Mehrzellen-Scanning

Für die photometrische Auswertung mehrerer gefärbter Zellen, wurde bei 40facher Vergrößerung ein Feld von 200  $\mu\text{m}$  mal 200  $\mu\text{m}$  mit einer Step rate in x- und y-Richtung von 0,75  $\mu\text{m}$  gescannt.

#### 7.2. Auswertung absorptionsphotometrischer Daten

Mit Hilfe des APAMOS-Programms wurde eine Reihe photometrischer Daten von Einzelzellen bzw. Zellen im Kollektiv ausgewertet (siehe Tabelle 1 im Anhang):

- a. Die Anzahl der Meßwerte innerhalb der vorgegebenen Schwellen, d.h. der Absorptionsgrenzwerte ("Thresholds").
- b. Die mittlere Extinktion, das ist die Summe der Extinktionsbeträge aller Meßwerte ("Pixel") dividiert durch die Anzahl der Meßwerte innerhalb der Schwellen. Dieser Wert wird proportional zur mittleren Farbstoffkonzentration gesetzt.
- c. Die Bezugsfläche in  $\mu\text{m}^2$  ( $= 1 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$ ). Diese Fläche ergibt sich aus der Multiplikation der Anzahl aller Meßpunkte, die innerhalb der Schwellenwerte einen Extinktionsbetrag einbringen, mit der durchschnittlichen Größe eines Flächenelementes, die bei der hier gewählten Schrittweite 0,25  $\mu\text{m}$  beträgt.
- d. Die mittlere Extinktion x Bezugsfläche innerhalb der Schwellenwerte. Diese Größe ist proportional zu der Farbstoffmenge innerhalb der Schwellenwerte eines Meßfeldes und kann somit proportional zu der Menge gebundener Antikörper im gemessenen Feld gesetzt werden.

### 7.3. Histogramm

Die relative Farbstoffmenge je Meßfeld wurde in einer Häufigkeitsverteilung für alle gemessenen Felder eines Präparates dargestellt. Dabei wurden die Werte in 12 gleich große Klassen eingeteilt.

### 7.4. Rastergraphik

Die im Scanningverfahren gemessenen einzelnen Extinktionswerte wurden in Klassen eingeteilt und entsprechend ihrer topographischen Verteilung in der Ebene ausgedruckt. Hierbei wurden Bereiche von unterschiedlicher Immunfärbung der Zelle als einstellige Zahlenwerte dargestellt. Auf diese Weise ließen sich Morphologie und spezifische Antikörperbindung simultan beurteilen. Diese Wiedergabeform entspricht dem bereits durch die Photographie vermittelten Eindruck der Antigenverteilung im Objekt, allerdings in einer objektiv erfaßten, quantitativen Form.

Zur Bestimmung der Eigenabsorption von Zellkern und ungefärbtem Cytoplasma wurde eine ungefärbte, vom jeweiligen monoklonalen Antikörper nicht erkannte Zelle unter Phasenkontrast eingestellt, fokussiert und anschließend gescannt.

Hierbei war keine nennenswerte Eigenabsorption meßbar, die die spezifische Absorption des Farbstoffes verfälschen würde. Alle schwach absorbierenden Meßpunkte mit einem Transmissionsgrad über 95% wurden der nicht absorbierenden Umgebung zugeordnet.

## 8. Mikrofluorometrie

### 8.1. Meßsystem

Die fluorometrischen Messungen wurden durchgeführt an einem Inversen Kamera-Mikroskop (Zeiss, IM 35) für Durchlicht und einer Zusatzeinrichtung für Auflichtfluoreszenz. Die Filterkombinationen BP 546/ FT 580/ LP 590 für Rotfluoreszenz und BP 450-490/ FT 510 / LP 520-560 für Grünfluoreszenz waren in einem Reflektorgehäuse untergebracht und konnten manuell durch Einschleben und Herausziehen des Reflektors umgeschaltet werden. Ein computergesteuerter Scanningtisch von 50 µm minimaler Schrittweite und mit Spezialhalterung für Objektträger diente der Verschiebung des Präparates unter dem Objektiv. Meßverstärkung, Tischsteuerung und Datenübermittlung zum Rechner erfolgte durch die Photometerelektronik MPC 64 (Carl Zeiss, Oberkochen). Zur Meßgeräteeinsteuerung und Meßwerterfassung wurde ein Computer HP 86-87 mit 64 kByte RAM eingesetzt. Die Meßsignale wurden über einen Photometeraufsatz SF registriert und durch einen Drucker ausgegeben. Die Datenübertragung zwischen Peripheriegeräten und Computer erfolgte über eine IEC-Bus- Kopplung. Als Beleuchtungseinheit für photometrische Messungen diente die stabilisierte Lichtquelle HBO100, für Beobachtungen im Hellfeld stand eine Quarz Halogen-Lampe zur Verfügung.

### 8.2. Meßvorgang

#### 8.2.1. Einzelzell- und Mehrzellen-Scanning

Zur Messung FITC-markierter Antigen-Antikörperkomplexe an Gliomzellen wurde die Filterkombination für Grünfluoreszenz eingesetzt. Bei 40facher Vergrößerung mit einer numerischen Apertur von 0,60 und einer runden Meßfeldblende von 2,5 mm Durchmesser entsprach die Größe des Meßfeldes in der Objektebene 60 µm im Durchmesser. Die Größe der Meßblende in der Objektebene war mittels einer Strichplatte im Einstellokular ersichtlich.

Es wurde ein Gesamtmeßfeld von 150 µm mal 150 µm, in dem eine oder mehrere Zellen lagen, mit einer Schrittweite von 50 µm in x/y - Richtung gescannt. Die geringgradige Überschneidung der Meßfelder war erwünscht zur Verringerung des sogenannten Rest-Verteilungsfehlers (Duijndam et al., 1980 a,b).

In jedem Präparat wurden analoge Bereiche stichprobenweise untersucht. Es war streng darauf zu achten, daß keine angeschnittenen Zellen im Meßfeld erschienen. Die Zahl der gescannten Zellen pro Meßfeld wurde protokolliert.

Die Fluoreszenzsignale von Einzelzellen oder Zellen im Kollektiv wurden nach Öffnen des Strahlenteilers im Phototubus über den Photomultiplier mit einer Spannung von 320 V und einem Verstärkungsfaktor von 10 registriert und, nach Zwischenspeicherung im Computer, vom Drucker

ausgegeben. Die Rohmeßdaten wurden dabei geometrisch für jedes gemessene Feld in einem Datenarray angeordnet, das entsprach pro gescanntem Feld neun Werten.

Zusätzlich wurden zur Bestimmung des Untergrundsignals ("Background") die Meßsignale von zehn Meßfeldern, in denen sich keine Zellen befanden, aufgenommen.

Nach dem Scannen eines Meßfeldes, wurde auf Rotfluoreszenz für Propidiumjodid umgeschaltet und alle rot fluoreszierenden Zellkerne ausgezählt und notiert. Manchmal waren Zellen mit zwei oder drei Zellkernen zu beobachten, die als ein Zellkern gewertet wurden. Durch diese Zweiwelkenlängenmethode konnte durch das Verhältnis der Werte für Grün- und Rotfluoreszenz der Anteil Immunreaktiver Zellen ermittelt werden (Jones u. Kniss, 1987). Pro Präparat wurden auf diese Weise durchschnittlich 100 Zellen ausgezählt und gemessen.

### 8.2.2. Scanning des Referenzmaterials

Bei der Messung des Referenzpräparates wurde in der gleichen Weise verfahren wie beim Einzelzell- und Mehrzellen-Scanning. Der verwendete Filtersatz entsprach dem für Grünfluoreszenz.

Zunächst wurde ein stark und ein schwach fluoreszierendes Referenzmaterial gemessen. Damit wurde die Empfindlichkeit des Gerätes über Photomultiplierhochspannung und Verstärkung so eingestellt, daß im oberen Meßbereich die Meßsignale der fluoreszierenden Partikel nicht durch Überstrahlen verfälscht wurden. Dieser Meßbereich wurde sowohl bei den gefärbten Sephadex-Partikeln als auch bei den fluoreszierenden Zellen mit einer konstanten Einstellung der Empfindlichkeit des Photomultipliers (Betriebsspannung = 320 V, Verstärkungsfaktor = 10) bei allen nachfolgenden Messungen eingehalten.

Es handelt sich hierbei um keine Eichung des Gerätes, sondern um eine Abgrenzung des Meßbereiches durch ein Vergleichsmuster für relative Messungen über einen definierten Zeitraum. Messungen über einen Zeitraum von 5 Monaten zeigten unveränderte Reproduzierbarkeit, ohne etwas am Gerät nachstellen oder korrigieren zu müssen.

Unter diesen Bedingungen lassen sich nachfolgende Messungen leicht nachvollziehen.

### 8.3. Bearbeitung der Rohmeßdaten

Als erster Schritt wurde von den Rohmeßdaten spezifischer Meßwerte pro Scanningfeld das Untergrundsignal abgezogen, dessen Wert aus dem Durchschnitt der zehn leeren Meßfelder ermittelt wurde. Dieses Untergrundsignal setzte sich zusammen aus Dunkelstrom des Photomultipliers, parasitärem Licht und unspezifischer Hintergrundfluoreszenz, die zum Teil durch das Einbettungsmedium verursacht wurde.

Die um den Hintergrund korrigierten Werte pro Meßfeld wurden addiert und ergaben die Fluoreszenzintensität pro gescanntem Feld. Um die Fluoreszenzintensität pro positiver Zelle zu erhalten, mußte dieser Summenwert noch durch die Anzahl der positiv vermerkten Zellen dividiert werden. So erhielt man die durchschnittliche Fluoreszenzintensität je Zelle aus dem jeweils gescannten Feld. Auf diese Weise wurden alle gescannten Felder eines Präparates bearbeitet.

Beim Einzelzell-Scanning erhielt man aus den um das Hintergrundsignal korrigierten Meßwerten ohne zusätzlichen Rechenschritt die Gesamtfluoreszenz pro Zelle.

#### 8.4. Statistische Auswertung der integrierten Scanningfelder pro Präparat.

Aus der gemessenen Anzahl der Scanningfelder pro Präparat wurden folgende statistische Parameter berechnet:

- a) Mittelwert  $\bar{x}$  als Durchschnitt aller Fluoreszenzintensitäten pro gescanntem Feld eines Präparates als Maß für die Menge Antikörper, die die Immunreaktiven Zellen eines Präparates im Durchschnitt gebunden haben.
- b) Standardabweichung  $s$  als Maß für die Heterogenität der Antikörperbindung an antigenpositive Zellen. Eine Standardabweichung von 0 würde bedeuten, daß alle Immunreaktiven Zellen die gleiche Menge Antikörper gebunden hätten. Je höher die Standardabweichung, desto größer also die Heterogenität des Materials in Bezug auf die Antikörperbindung.
- c) Variationskoeffizient  $s/\bar{x}$ . Er entspricht der mit dem Mittelwert als Einheit gemessenen Standardabweichung und erlaubt durch diese Relativierung den Vergleich von Präparaten mit unterschiedlichen Durchschnittswerten der Fluoreszenzintensität.
- d) Varianz  $s^2$  als mittlere quadratische Abweichung, auch Streuung genannt. Diese Größe wird für den t-Test, wie im Abschnitt 8.6 beschrieben, gebraucht.
- e) die gesamte Anzahl  $n_g$  und die Anzahl immunreaktiver Zellen  $n_p$
- f) der Prozentsatz Immunreaktiver Zellen  $n_p/n_g \times 100$

#### 8.5. Zusammenstellung der Meßdaten und Ordnung nach bestimmten Kriterien.

Die gesamten Meßdaten wurden in der Reihenfolge nach Versuchsdatum, Tumornummer, Passagestadium, verwendetem monoklonalen Antikörper, Fixierung, Erkennungsraten und Fluoreszenzintensitäten in einer Tabelle eingeordnet (siehe Tabelle 2 im Anhang).

## 8.6. Statistische Auswertung durch zweiseitiges Prüfverfahren nach Student (t-Test)

Zur Feststellung, ob zwei Stichproben zu einer Grundgesamtheit gehören, wurde der t-Test angewandt. Dabei erfolgte die Auswahl von Wertepaaren nach definierten Gesichtspunkten. Nur eine unabhängige Variable durfte sich in einem Wertepaar unterscheiden. Waren aber gleichzeitig zwei Variablen (z.B. Fixierung, Passagestadium) in einem Wertepaar verändert worden, konnte der t-Test nicht angewendet werden. Führt eine Prüfung mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ) zur Feststellung eines Unterschieds, so wurde die Null-Hypothese, im Folgenden  $H_0$  genannt, verworfen und die Alternativhypothese - die Grundgesamtheiten unterscheiden sich - angenommen. Der Unterschied wurde als signifikant oder als auf dem 5%-Niveau statistisch gesichert bezeichnet.

Der berechnete Tabellenwert  $t_b$  wurde nach folgender Formel ermittelt (Sachs, 1978):

$$t_b = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

$\bar{x}_1, \bar{x}_2$  = Mittelwerte des zu vergleichenden Wertepaares

$n_1, n_2$  = Anzahl Zellen bzw. Scanning-Felder je Wertepaar

$s_1, s_2$  = Standardabweichung der Mittelwerte

## II. Ergebnisse

### A. Absorptionscytophotometrie

#### 1. Quantifizierung zellgebundener Antikörper

Für alle Meßfelder eines Präparates wurden die berechneten Werte "Mittlere Extinktion x Bezugsfläche", die als ein relatives Maß für die Menge spezifisch gebundener Antikörper angesehen werden können, in Größenklassen eingeteilt und eine Häufigkeitsverteilung für jede gemessene Tumorzelllinie erstellt (Abb. 1 a-c).

Die Bindung von MUC 14-22 an Zellen der permanenten Gliomlinien 85HG-64 und 86HG-66-T6 wurde in zwei analogen Meßbereichen mit je 16 Zellen innerhalb eines Präparates photometrisch gemessen. In diesen Stichproben zeigte sich eine differenzierte Verteilung der Extinktionswerte je Meßfeld. Im ersten Meßbereich mit 16 gemessenen Zellen der Gliomlinie 86HG-66-T6 zeigten 4 Zellen einen sehr niedrigen Extinktionswert, d.h. sie wurden durch MUC 14-22 nur sehr schwach erkannt. Im selben Meßfeld wurde weiterhin eine Zelle erfaßt, die den höchsten Wert (mittlere Extinktion x Bezugsfläche) von allen 32 gemessenen Zellen aufwies. Dabei zeigten die vier genannten Zellen mit der niedrigsten Antikörperbindung nur 1-6% des Wertes dieser am stärksten absorbierenden Zelle. Die Werte der übrigen Zellen lagen zwischen 20 bis 70 % dieses maximalen Wertes (Abb 1 a).

Die Bindungskapazität von MUC 14-22-Antikörpern an Zellen der Linie 85HG-64 war im Durchschnitt ca. 50% geringer als an 85HG-66-T6-Zellen. Hierbei war die Zelle mit dem höchsten Wert, d.h. der stärksten Antikörperbindung, lediglich 4 mal höher als die Zelle mit dem niedrigsten Wert (Abb. 1b).

Das Bindungsverhalten von MUC 14-22 an Zellen der Linie 85HG-64 und von MUC 8-22 an Zellen der Linie 85HG-65 war untereinander vergleichbar (Abb. 1b,c), wenn man berücksichtigt, daß von der letztgenannten Tumورlinie nur 16 Zellen ausgewertet wurden..

## 2. Verteilungsmuster der Antikörperbindungsstellen

Die Möglichkeit der quantitativen Darstellung des Verteilungsmusters von Antikörperbindungsstellen auf der Ebene von Einzelzellen wurde wie folgt exemplifiziert:

Das Verteilungsmuster der Bindung von MUC 8-22 an 4 nicht fixierte Zellen der permanenten Gliomzelllinie 85HG-66 wurde in einem Pixelabbild dargestellt (Abb.2). Die einstelligen Werte repräsentierten die Transmissionsklassen. Dabei entsprach die niedrigste Zahl 4 einer Transmission von 35 bis 44,9% und die höchste Zahl 9 einer Transmission von 85 bis 94,9%.

Hierdurch wurde die unterschiedliche Verteilung des Farbstoffes an verschiedenen Orten der Zelle sichtbar, niedrige Partialwerte entsprachen einer starken und hohe Partialwerte einer geringen Antikörperanlagerung. Sie waren unregelmäßig inselförmig über das gesamte Cytoplasma der Zellen verteilt. Eine besonders starke Antikörperbindung trat an den Berührungsstellen benachbarter Zellen auf.

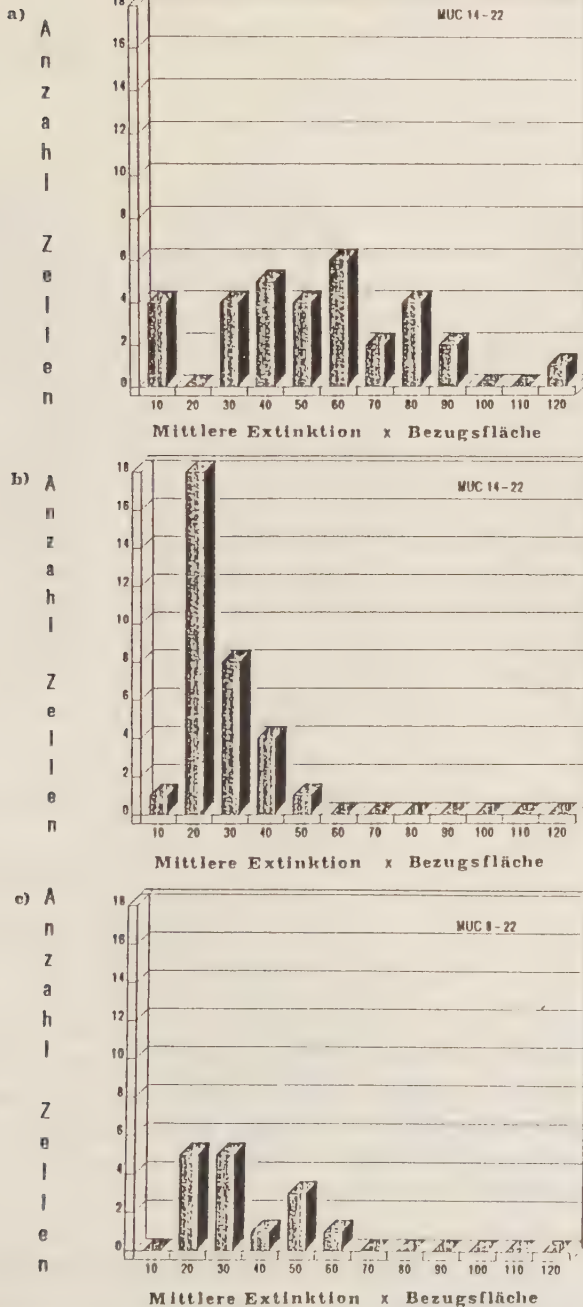


Abb. 1: Häufigkeitsdiagramm für mittlere Extinktion x Bezugsfläche je Zelle als relatives Maß für die Menge gebundener Antikörper. Bindungsreaktion dargestellt mittels Indirekter Immunperoxidasefärbung. Umgesetztes Substrat gemessen durch Absorptionsphotometrie von Einzelzellen der Gliomlinien

a) 85HG-66-T6, b) 85HG-64 und c) 85HG-65


$$ZK = Ze$$

## B. Mikrofluorometrie

### 1. Einzelzell-Scanning

In zwei Meßreihen konnte die Bindung von MUC 2-63 an einzelne Tumorzellen der Linie 85HG-64 gemessen werden. Im ersten Präparat wurden 18 Zellen gescannt mit einem arithmetischen Mittelwert  $\bar{x}$  von 13,3 willkürlichen Einheiten (A.U. = Arbitrary Units) und einer Varianz  $s^2 = 88.4$  und im zweiten Präparat 32 Zellen mit einem  $\bar{x}$  von 11.7 A.U. und einer Varianz von  $s^2 = 21.2$ .

Aus diesen Werten wurde im t-Test ein  $t_0$ -Wert von 0.81 berechnet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und einem Freiheitsgrad von  $(18 + 32) - 2$  betrug der Tabellenwert 2.01. Die  $H_0$  mußte in diesem Fall verworfen werden, d.h. beide Werte gehörten einer Grundgesamtheit an. Die Einzelwerte wurden dann zusammengefaßt zu einem gewogenen Durchschnittswert von 12.3 A.U. und einer zugehörigen Varianz von  $s^2 = 44.8$ . Dieser Wert wurde im t-Test mit 27 gescannten Feldern eines Präparates der gleichen Tumorzelllinie, welche mit dem gleichen Antikörper gefärbt und im Zellkollektiv gemessen worden waren, verglichen. Letztere enthielten zusammen 150 immunreaktive Zellen und zeigten einen Mittelwert  $\bar{x}$  von 11.7 A.U. mit einer Varianz  $s^2 = 5.8$ .

Der t-Test lieferte einen berechneten Wert von 0.45 und einen zugehörigen Tabellenwert  $t_0$  von 1.99. Die  $H_0$  mußte folglich auch hier verworfen werden, d.h. es lag kein signifikanter Unterschied zwischen Einzelzell-Scanning und Mehrzellen-Scanning vor.

### 2. Mehrzellen-Scanning

#### 2.1.Reproduzierbarkeit

##### 2.1.1. Prüfung auf Kurzzeitvariationen

Unter Kurzzeitvariationen wurden Unterschiede innerhalb von Meßreihen verstanden, die auf apparativen und präparativen Einflüssen beruhen könnten. Mehrere Präparate einer Tumorzelllinie wurden über einen Zeitraum von 2 bis 3 Wochen an unterschiedlichen Tagen immunocytochemisch gefärbt und gemessen. Vergleichbare Präparate wurden zu Wertepaaren zusammengefaßt und mittels des t-Testes geprüft. Aus der Tabelle 3a (siehe Anhang) ist ersichtlich, daß alle Meßreihenpaare mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit zu einer Grundgesamtheit gehörten.

##### 2.1.2. Prüfung auf Langzeitvariationen

Bei diesen Variationen wurde der Einfluß oben genannter Parameter über einen Meßzeitraum von etwa vier Monaten verfolgt. An 3 Beispielen aus der Reihe der permanenten Gliomzelllinien wurden eingefrorene Cytospin-Präparationen wiederholt mit dem gleichen Antikörper immun-

cytochemisch gefärbt und fluorometrisch ausgewertet. Auch in diesen Fällen konnte mit Hilfe des jeweils durchgeführten t-Testes die  $H_0$  verworfen werden und dies bedeutete, daß die Meßreihenpaare einer Grundgesamtheit angehörten (Tab.3b Im Anhang).

Daraus kann man folgern, daß während des gesamten Zeitraumes alle Messungen unter konstanten apparativen und präparativen Bedingungen ausgeführt wurden.

## 2.2. Scanning des Referenzmaterials

Von verschiedenen Referenzpräparationen wurde eine unterschiedliche Zahl von Partikeln fluorometrisch gemessen und ergaben folgende Intensitäten:

| Präparat | Mittlere Fluoreszenzintensität<br>pro Partikel x (A.U.) | Standardabweichung<br>s |
|----------|---------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1        | 52,7                                                    | 11,1                    |
| 2        | 55,8                                                    | 15,8                    |
| 3        | 54,5                                                    | 13,1                    |
| 4        | 56,2                                                    | 7,3                     |

Um festzustellen, inwieweit sich das Referenzmuster konstant verhielt, wurden die gemessenen Werte im t-Test verglichen. Mit einer Sicherheit von 95% handelte es sich hier um einheitliche Präparate aus einer Grundgesamtheit. Zur Einstellung des Meßbereiches wurden im allgemeinen 5 oder 6 Werte gemessen und deren Mittelwert als Bezugswert für den Meßbereich verwendet.

## 3. Vergleich Innerhalb einzelner Gliomzelllinien

### 3.1. Erkennungsraten von monoklonalen Antikörpern Innerhalb einzelner Gliomzelllinien

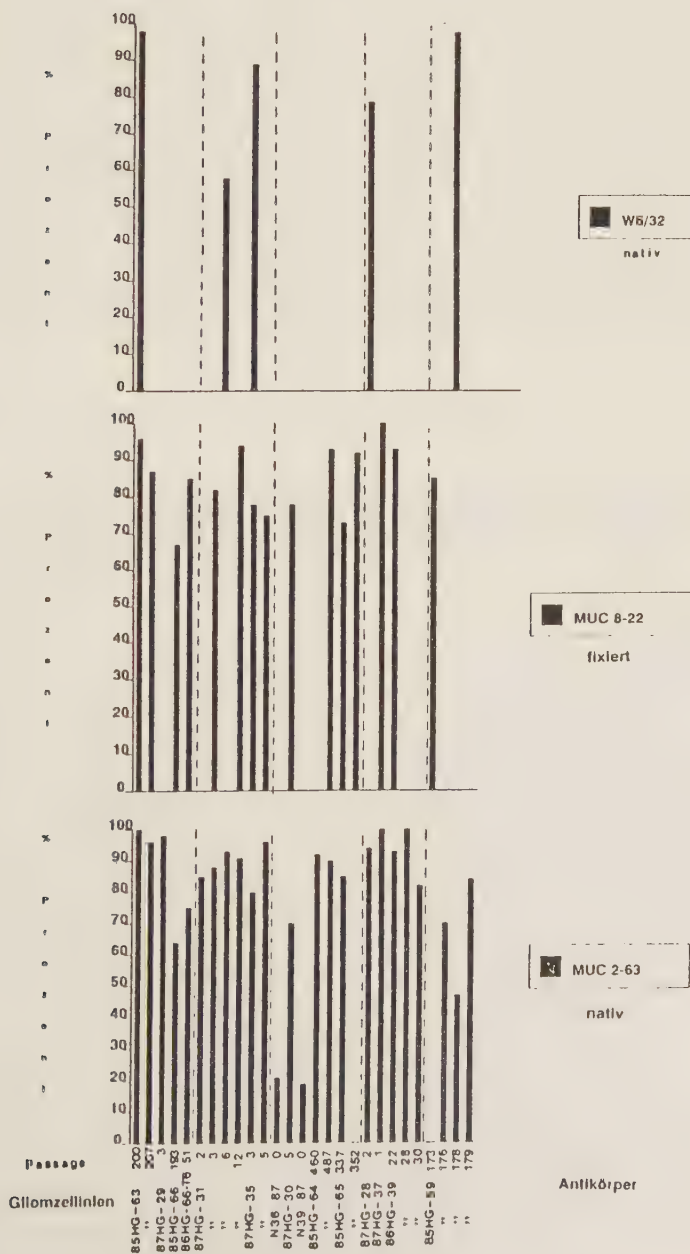
Alle gemessenen Werte sind im Anhang aufgeführt (Tab. 4 a und b).

An einigen Beispielen wird gezeigt, wie sich die Stichproben aus verschiedenen Präparaten einer Tumorzelllinie, die mit dem gleichen Antikörper inkubiert worden waren, hinsichtlich ihrer Streuung verhielten (Tab. 4b). Damit wird ein Eindruck vermittelt, mit welcher Genauigkeit die Anzahl immunreaktiver Zellen dargestellt werden kann.

#### 3.1.1. Kurzzeitkulturen

Kurzzeitkulturen aus einem Glioblastom (N 28/87) und einem Astrocytom II (N 29/87) wurden von MUC 2-63 anscheinend zu 100 % erkannt. Wegen der geringen Anzahl an ausgezählten Gliomzellen ist diese Aussage wohl statistisch nicht ausreichend abgesichert (Tab. 4a). Ein Einfluß der Fixierung auf die Erkennungsrate von 87HG-29 Zellen durch den Antikörper MUC 2-63 war nicht

Abb. 3: Erkennungsraten monoklonaler Antikörper in Prozent (%).



ersichtlich (Tab. 4a). MUC 2-63 und MUC 8-22 zeigten eine ähnliche Erkennungsrate bei einem in vitro propagierten Oligodendrogliom II (N 30/87). Bei einem in vitro kultivierten Astrocytom III (N 31/87) zeigte MUC 2-63 anscheinend geringere Bindung in der 2. und 3. Passage gegenüber der 6. und 12. Passage. Zwischen der 6. und 12. Passage bestand dagegen kein Unterschied (Abb. 3). Ein ähnlicher Befund konnte für MUC 8-22 erhoben werden, der in der 3. Passage bei Addition der gezählten Zellen aus zwei Stichproben nur 82 %, hingegen in der 12. Passage 94 % erkannte (Tab. 4a). Auch bei W 6/32 zeigte sich eine Parallelität zwischen steigender Erkennungsrate und höherer Passagezahl (Tab. 4a, Abb. 3). Bei der Kurzzeitkultur eines weiteren Astrocytoms III (N 35/87) war ebenso ein Einfluß des Passagestadiums auf die Erkennungsrate durch MUC 2-63 zu beobachten, hingegen nicht bei MUC 8-22 (Tab. 4a). Bei der 3. Passage zeigte der MUC 8-22-Antikörper eine höhere Erkennungsrate als bei der 5. Passage. Die aus Primärtumoren gewonnenen Zellsuspensionen (N36/87: Astrocytom III und N39/87: Oligodendrogliom III) enthielten insgesamt sehr niedrige Werte positiver Zellen bei Verwendung von MUC 2-63.

### 3.1.2. Langzeitkulturen

Bei den untersuchten Langzeitzellkulturen eines Glioblastoms (N 39/86) zeigten weder Fixierung noch Passagestadium signifikanten Einfluß auf die Anzahl erkannter Zellen (Tab. 4a, Abb. 3). Die drei getesteten Antikörper (MUC 8-22, MUC 2-63, W6/32) waren in ihrer hohen Erkennungsrate vergleichbar.

### 3.1.3 Permanente Gliomzelllinien.

Unter den permanenten Tumorzelllinien war bei der 85HG-59-Gliomlinie eine erhebliche Variabilität hinsichtlich der Anzahl antigenpositiver Zellen zu beobachten (Tab. 4a, Abb. 3). Hierbei zeigte MUC 2-63 in der 178. Passage zu ca. 73 % Bindung an fixierte und nur zu ca. 47 % an native Zellen. Native Zellen der 176. Passage wurden zu 70 %, jene der 179. Passage zu 84 % vom MUC 2-63-Antikörper erkannt. Die meisten mit MUC 8-22 positiv reagierenden Zellen waren in der 173. Passage dieser Linie zu verzeichnen, während der gleiche Antikörper native 85HG-59-Zellen der 178. Passage nur zu 25 % erkannte (Tab. 4a). Bei der Astrocytomlinie 85HG-63, die zur Immunisierung der Balb/c-Mäuse Verwendung fand, wurden in der 200. Passage von MUC 2-63 in nativer und fixierter Form alle Zellen erkannt (Tab. 4a). Darüberhinaus wurden die Zellen dieser Gliomlinie in der 200. Passage auch von den beiden anderen Antikörpern zu einem sehr hohen Prozentsatz erkannt (Abb. 3). In der 207. Passage der gleichen Linie zeigte MUC 8-22 anscheinend eine um etwa 10 % geringere Erkennungsrate gegenüber der 200. Passage (Tab. 4a). Bei einer anderen Astrocytomlinie (85HG-66) erkannten MUC 8-22 und MUC 2-63 gleich viele Zellen innerhalb der Streubreite des Erkennungsbereiches. Bei einer Grundgesamtheit von 485 Zellen aus 6 Präparaten, ergab sich für MUC 2-63 ein Durchschnittswert von 64 % erkannter Zellen mit einer Standardabweichung von 12% (Tab. 4b). Bei der nach einer in vivo Passage in der Maus in vitro etablierten Kultur (86HG-66-T6) der Tumorzelllinie (85HG-66) bestand hinsichtlich der Erkennungsrate bei beiden Antikörpern kein ausgeprägter Unterschied. Die Zellen der 51. Passage

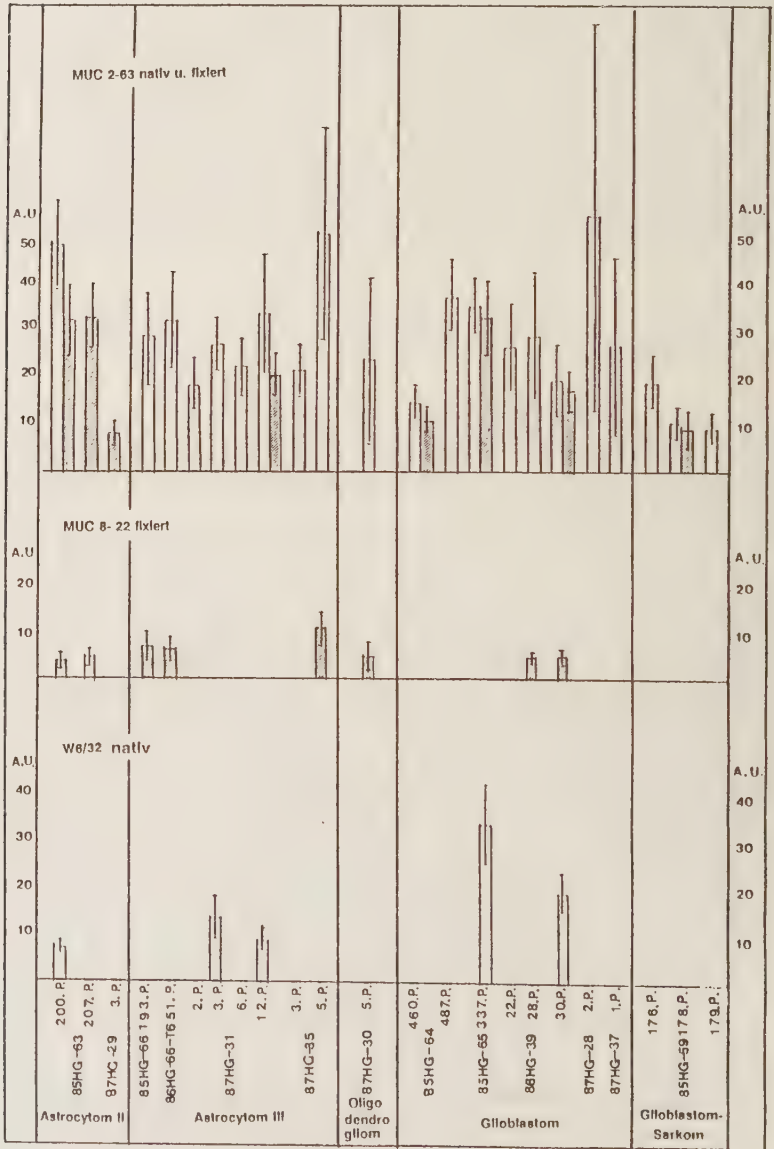
dieser Tumormlinie wurden von MUC 2-63 zu ca. 75 % erkannt (Abb. 5a,b). Bei einer Grundgesamtheit aus 5 Stichproben von etwa 100 Zellen schwankte dieser Wert mit einer Standardabweichung von 10 % (Tab. 4b). MUC 8-22 lag um 85 % in der Erkennungsrate bei geringerer Streuung (Tab. 4b). Ein homogenes Erkennungsmuster wurde bei der Glioblastomlinie (85HG-64) bezüglich der Erkennung durch MUC 2-63 in der 460. Passage beobachtet. Bei Zusammenlegen der gezählten Zellen aus 4 einzelnen Präparaten wurden ca. 92 % erkannt mit einer Standardabweichung von 1,5 % (Tab. 4b). Die Erkennungsrate in der 460. und 487. Passage unterschied sich nicht. MUC 8-22 verhielt sich im Prozentsatz erkannter Zellen ähnlich wie MUC 2-63 (Tab. 4a). Bei einer weiteren Glioblastomlinie (85HG-65) unterschied sich das Erkennungsspektrum von MUC 2-63, MUC 8-22 und W6/32 infolge der höheren Streuung nicht wesentlich (Tab. 4 a,b). Die 352. Passage der gleichen Linie ließ für MUC 8-22 mit 92% einen hohen Bindungswert vermuten. Außerdem war bei MUC 2-63 ein Einfluß der Fixierung auf die Markierungsrate zu beobachten, da in fixiertem etwa 20 % weniger Zellen als in nativem Zustand erkannt wurden (Tab. 4a).

### 3.2. Vergleich der Fluoreszenzintensitäten innerhalb einzelner Gliomzelllinien

Wie aus Tabelle 5 im Anhang bzw. dem Histogramm (Abb. 4) ersichtlich, erzeugten die verschiedenen Antikörper an den jeweils getesteten Tumorzelllinien statistisch gesicherte unterschiedliche Fluoreszenzintensität.

Die meßbare Fluoreszenzintensität der Bindung von MUC 8-22 an 85HG-63-Zellen (Abb. 5c) war mit einem Wert von ca. 5 A.U. insgesamt schwach, wobei zwischen der 200. und 207. Passage kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Die durch spezifische Bindung von W6/32 erzeugte Emission lag etwas höher als bei der Verwendung von MUC 8-22. Eine starke Emission war hingegen durch MUC 2-63 mit Bindung an fixierte Zellen in der 200. und 207. Passage der gleichen Tumormlinie mit ca. 33 A.U. zu verzeichnen. Die Fluoreszenzintensität von Zellen im nativen war mit 50 A.U. deutlich höher als im fixierten Zustand. Die Bindungskapazität von MUC 8-22 an die Gliomzelllinien 85HG-66 und 86HG-66-T6 lag im Bereich von 7 bis 8 A.U., die von MUC 2-63 bei etwa 30 A.U. mit einer relativ hohen Standardabweichung von 10 A.U. Der Bindungsgrad von MUC 2-63 an 87HG-31-Zellen bestätigte die Tendenz eines Anstiegs der Fluoreszenzintensität der Immunreaktiven Zellen mit steigender Passage. W6/32 lag in der Erkennungsintensität bei dieser Tumorkultur um etwa 50% niedriger als MUC 2-63, ohne meßbaren Einfluß der in vitro Propagierungsrate. Auch hinsichtlich der Bindungsaffinität von MUC 2-63 an die Gliomzelllinien 87HG-35 bestand zwischen der 3. und 5. Passage ein Anstieg in der Fluoreszenzintensität. Die 5. Passage mit einem Wert von 50 A.U. war jedoch mit einer hohen Standardabweichung versehen. MUC 8-22 lag hinsichtlich der Erkennungsintensität bei der 5. Passage dieser Gliomzellkultur um ein mehrfaches niedriger als MUC 2-63, verbunden mit geringerer Streuung. Der Grad gebundener MUC 2-63-Antikörper an 85HG-59-Zellen in der 176. Passage lag höher als in der 178. und 179. Passage und stand damit im Widerspruch zu den vorherigen Beobachtungen. Bei 85HG-64-Gliomzellen und dem gleichen Antikörper war wiederum ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität von der 460. auf die 487. Passage zu messen. Der Bindungsgrad von MUC 2-63 und

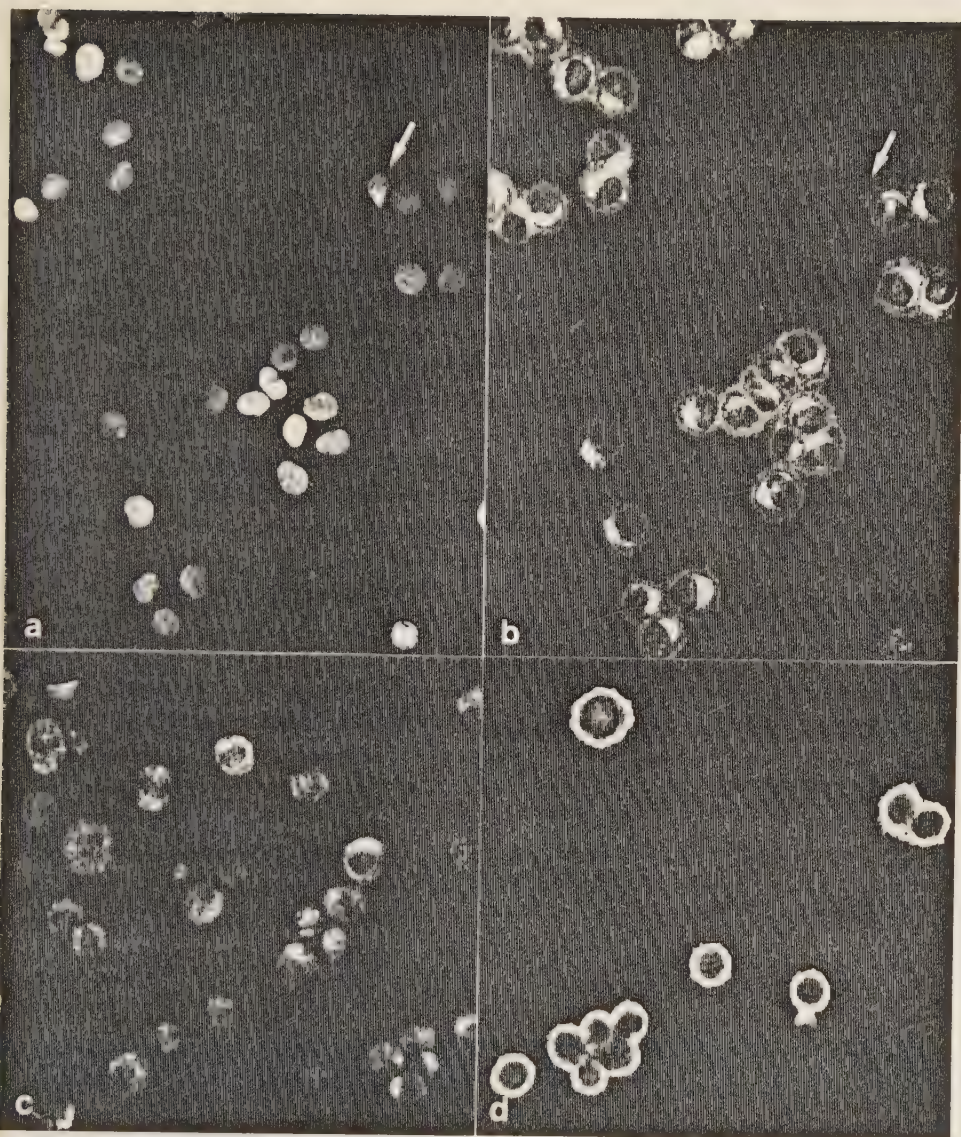
Abb. 4: Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität nach Bindungsreaktion von drei monoklonalen Antikörpern mit verschiedenen Gliomzelllinien.



□ = fixiert

| = Grösse der Standardabweichung

1



- Abb. 5:
- a) Rotfluoreszenz von Zellkernen der Gliomlinie 85HG-66-T6 nach Kernfärbung mit Propidiumjodid.
  - b) Darstellung der Antikörperbindung MUC 2-63 an die gleiche Gliomzelllinie. Einzelne Zellen zeigen Kern -, jedoch keine Immunfluoreszenz. ( ← )
  - c) Nach Antikörperbindung mit MUC 8-22 sind bei Methanol-Acetonfixierten Zellen der Gliomlinie 85HG-63 (200. Passage) die fluoreszierenden Strukturen Intracytoplasmatisch gelegen.
  - d) Native Zellen der Gliomlinie 87HG-31 (12. Passage) zeigen nach Bindungsreaktion mit dem Antikörper MUC 2-63 deutliche Membranfluoreszenz.

( Indirekte Immunfluoreszenz-Technik auf Cytospin-Präparationen, x400 )

W6/32 zeigte an 85HG-65-Zellen keinen signifikanten Unterschied. Die Bindungskapazität von MUC 2-63 an 86HG-39-Zellen in der 22. und 28. Passage war gleich, in der 30. Passage dagegen abfallend. Hingegen zeigte MUC 8-22 durchweg schwächere Reaktivität als MUC 2-63. Eine 5fach stärkere Bindungsintensität wies MUC 2-63 gegenüber MUC 8-22 an 87HG-30-Zellen auf.

#### 4. Vergleich zwischen Gliomzelllinien

##### 4.1. Antikörperdefinierte Erkennungsraten zwischen Gliomzelllinien

Die untersuchten Astrocytomlinien II (87HG-29, 85HG-63) wurden von den drei Antikörpern MUC 8-22, MUC 2-63 und W6/32 sowohl in fixiertem, als auch in nativem Zustand fast vollständig erkannt (Tab. 4a). Bei den Astrocytom III-Linien (87HG-31 u. 87HG-35) wurden von MUC 2-63 ca. 90% und von MUC 8-22 zwischen 75 und 95% der Zellen markiert. Nicht kultivierte Zellen des gleichen Gliomtyps (N36/87) wurden von MUC 2-63 zu etwa 20% erkannt (Tab. 4a, Abb. 3). 85HG-66-Zellen wurden von MUC 2-63 und von MUC 8-22 um 60 bis 70% erkannt. Die aus einem Transplantat in vitro etablierte Zelllinie (86HG-66-T6) zeigte im Vergleich zu der Ursprungslinie (85HG-66) einen höheren Prozentsatz positiver Zellen (ca. 80%). Von den Oligodendrogliom-Zelllinien wurden 87HG-30 (Oligodendrogliom II) von MUC 2-63 zu etwa 70% und von MUC 8-22 zu ca. 80% erkannt. Die Erkennungsrate von MUC 8-22 und MUC 2-63 betrug bei nicht kultivierten Zellen eines Oligodendroglioms III (N39/87) ca. 20% und war damit vergleichbar mit dem bei N36/87 erzielten Ergebnis (Tab. 4a, Abb. 3). Bei den in vitro propagierten Glioblastomen (85HG-64, 85HG-65, 86HG-39, 87HG-28 und 87HG-37) war das Erkennungsspektrum von MUC 2-63 insgesamt sehr hoch. Es wurden durchschnittlich 90% der Zellen erkannt. MUC 8-22 verhielt sich hinsichtlich der Erkennung der genannten Zelllinien ähnlich, mit Ausnahme der 85HG-65-Linie in der 337. Passage, die auch von W6/32 geringfügig schwächer erkannt wurde. Bei der 85HG-59-Gliomlinie wurden in der 173. Passage von MUC 8-22 85% der Zellen erkannt. Bei MUC 2-63 lag der Erkennungsgrad in der 176. und 179. Passage auf einer Höhe von 70 bis 84%. Dagegen wurden in der 178. Passage nur ca. 50% der Zellen von diesem Antikörper erkannt (Tab. 4a, Abb. 3)

##### 4.2. Vergleich von Fluoreszenzintensitäten

Bei den in vitro propagierten Astrocytomen II zeigte MUC 2-63 an 85HG-63-Zellen einen starken Bindungsgrad, während MUC 8-22 und W6/32 nur zu einer schwachen Fluoreszenzintensität führten. 87HG-29-Zellen wurden in fixierter Form von MUC 2-63-Antikörpern schwach markiert (Tab. 5). Die Fluoreszenzintensitäten der Bindung von MUC 2-63 an Astrocytom III-Zelllinien (85HG-66 bzw. 86HG-66-T6 und 87HG-31-Zellen der 12. Passage (Abb. 5d)) waren in einem Bereich von 30 A.U. vergleichbar. W6/32 zeigte durch Bindung an 87HG-31-Zellen eine um die Hälfte bis ein Drittel geringere Fluoreszenzintensität als MUC 2-63 (Tab. 5). Von allen untersuchten Astrocytom-Zelllinien zeigten die 87HG-35-Zellen mit MUC 2-63 die höchste Fluoreszenzintensität, die allerdings mit einer hohen Streuung verbunden war (Tab. 5, Abb. 3). Die Bindung von MUC 8-22 an Zellen von 85HG-66 und 86HG-66-T6 war insgesamt geringer als bei den 87HG-35-Zellen. Das in

vitro etablierte Oligodendrogliom II (N30/87) wurde am stärksten durch MUC 2-63 markiert, wobei die Fluoreszenzintensität im mittleren Bereich lag (25 A.U.). Hingegen war die Fluoreszenzemission bei Verwendung von MUC 8-22 wesentlich geringer (Tab. 5). Bei den in vitro etablierten Glioblastomen lagen bei Verwendung von MUC 2-63 alle Intensitäten auf einem Niveau von 30 bis 40 A.U. mit Ausnahme von 85HG-64 (460.P.), 86HG-39 (30.P.) und 87HG-28 (2.P.). MUC 8-22 zeigte mit Bindung an 86HG-39-Zellen im Vergleich zu den anderen Antikörpern (MUC 2-63 und W6/32) ein um ein Viertel bis ein Sechstel niedrigere Fluoreszenz (Tab. 5). Das in vitro etablierte Glioblastom-Sarkom (85HG-59) lag in der Fluoreszenzintensität nach Bindung von MUC 2-63 um die Hälfte niedriger als die Meßwerte der Glioblastomlinien, die mit dem gleichen Antikörper markiert worden waren (Abb. 4, Tab. 5).

Allgemein wurden Zellen in fixierter Form von MUC 2-63 schlechter markiert als Zellen in nativem Zustand.

Bei Verwendung dieses Antikörpers ist die Streuung besonders hoch bei niedrigen Passagen einer Tumorzelllinie (87HG-35 (5.P.), 87HG-30 (5.P.), 87HG-28 (2.P.) und 87HG-37 (1.P.)) bei Verwendung dieses Antikörpers (Tab. 5, Abb. 4).

## E. DISKUSSION

### 1. Meßmethodik

Für die Erarbeitung einer quantitativen Methode zur Messung von Antikörperbindungsreaktionen stand ein institutselbstenes Inverses Mikroskop (IM 35, Carl ZEISS, Oberkochen) mit Photometeraufsatz und Scanningtisch zur Verfügung. Unter Berücksichtigung des sog. Inhomogenitätsfehlers war dieses Meßgerät nur für fluorometrische, jedoch nicht für Absorptionsmessungen geeignet, da die minimale Schrittweite des Scanningtisches von  $50\text{ }\mu\text{m}$  kein hochauflösendes Scanning-Verfahren erlaubte.

Es ist jedoch grundsätzlich möglich, die Bindung von Antikörpern an Einzelzellen durch Absorptionsphotometrie zu quantifizieren, wenn die lineare Auflösung ausreichend hoch wäre. Zu diesem Zweck wurde ein Meßgerät der Firma ZEISS zeitweilig zur Verfügung gestellt, mit dem eine 100fach höhere Auflösung erreicht werden konnte.

Die Vor- bzw. Nachteile beider Meßmethoden werden nachfolgend diskutiert:

#### 1.1. Absorptionscytophotometrie

Die Absorptionscytophotometrie ist von Vorteil, wenn Zellmorphologie und Erkennungsmuster monoklonaler Antikörper objektiv erfasst werden sollen. Wie aus den vorliegenden Ergebnissen ersichtlich, ist es mit Hilfe der Scanning-Methode grundsätzlich möglich, das Verteilungsmuster spezifisch gebundener Antikörper an einzelne Gliomzellen indirekt mittels Immunocytochemischer Darstellung von Antigen-Antikörperkomplexen photometrisch zu bestimmen. Durch das schrittweise Abtasten einzelner Zellen läßt sich ein quantitatives Bild von Antigenvorkommen an und innerhalb einer Gliomzelle erbringen. In Abhängigkeit vom Auflösungsvermögen, das durch die Größe des Meßfeldes in der Bildebene und die Schrittweite im Scanning gegeben ist, lassen sich mit rasterförmigen Analysen eine unterschiedliche Verteilung des Farbstoffes an verschiedenen Orten der Zelle erfassen. Die kleine Schrittweite bei diesem Scanningverfahren, in diesem Fall  $0,5\text{ }\mu\text{m}$  in x/y-Richtung, ist zur Vermeidung des Inhomogenitätsfehlers nötig und bedingt einen hohen apparativen und zeitlichen Aufwand.

Die Vorteile einer photometrischen Quantifizierung sind vor allem eine objektive und reproduzierbare Interpretation Immunocytochemisch gefärbter Präparate. Auf diese Weise können auch sehr kleine, visuell nicht wahrnehmbare Intensitätsunterschiede, sowie Feinstrukturen herausgestellt werden. Es ermöglicht weiterhin den Vergleich der Bindung von Antikörpern an Zellen unterschiedlicher Art und Größe, da die Bindungsreaktion als Produkt aus mittlerer Extinktion und der Bezugsfläche ausgedrückt wird. Die Bezugsfläche ist die Summe aller Meßpunkte ("Pixel") mit einer Fläche von jeweils  $0,25\text{ }\mu\text{m}^2$  innerhalb der gewählten Schwellen ("Thresholds") und somit ein Maß für die bindungsreaktive Fläche.

Die Anwendung dieses Meßverfahrens für Immunenzymatische Nachweismethoden hat den Vorteil, daß die Präparate über längere Zeit haltbar sind, so daß auch wiederholte Beurteilungen einer Zellpopulation möglich sind.

## 1.2. Mikrofluorometrie

Die einfachste Methode einer Quantifizierung fluoreszierender Präparate stellt die subjektive Abschätzung der Helligkeit des Fluoreszenzsignals dar, ausgedrückt als eine Anzahl von + - Zeichen.

Unterschiede in der Fluoreszenzintensität können nur erfahrene Personen bewerten und auch nur dann, wenn die Präparate zur gleichen Zeit vorgelegt werden, da das visuelle Gedächtnis für Fluoreszenzintensitäten gering ausgeprägt ist (Kawamura u. Aoyama, 1983).

Die Verwendung der Mikrofluorometrie gestattet den Vergleich von Ergebnissen aus Immunocytochemischen Reaktionen unter der Voraussetzung, daß eine lineare Beziehung besteht zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität und der Menge gebundener Antikörper bzw. der Dichte der durch diese Antikörper definierten Antigendeterminanten (Byers u. Johnston, 1977; Poncelet u. Carayon, 1985).

Die Sensitivität und Genauigkeit cytofluorometrischer Messungen sind schwer zu bestimmen. Im Prinzip ist die Beziehung zwischen Meßwert und Menge fluoreszierender Substanz exponentiell, aber für niedrige Absorptionswerte nach Prenna et al. (1974) und Rundquist (1981) fast linear.

Für die Zuverlässigkeit photometrischer Meßmethoden müssen weiterhin mehrere Bedingungen erfüllt sein. So muß die Immunocytochemische Präparation zuverlässig sein, das heißt reproduzierbar, selektiv und so spezifisch wie möglich.

Die präparative Behandlung des Materials erfordert daher eine standardisierte Technik, deren Reproduzierbarkeit besonders für Vergleichsmessungen wichtig ist. Im Gegensatz zum anpassungsfähigen System Auge/Gehirn des Menschen ist die cytophotometrische Methodik in viel stärkerem Maß auf die Reproduzierbarkeit der Färbemuster angewiesen.

Die Reproduzierbarkeit von quantitativen Messungen ist auch abhängig von Variationen im Meßsystem. Rundquist (1981) unterschied hierbei Kurzzeit- und Langzeitvariationen, die auf Veränderungen in der Färbetechnik oder in den optischen Verhältnissen im Instrument beruhten. Dabei war nach seiner Ansicht eine Standardabweichung von 7% für Messungen über einen Zeitraum von 5 Monaten akzeptabel. Wird dagegen eine höhere Präzision gefordert, ist es notwendig, einen chemischen oder biologischen Standard von gleicher Größe und spektralen Eigenschaften wie das zu messende Objekt in die Untersuchungen mit einzubeziehen (Haaijman, 1984). Der in diesen Untersuchungen verwendete künstliche "Standard" aus gefärbten Sephadex-Partikeln zeigte zwar reproduzierbare Meßwerte in der Fluoreszenzintensität, war aber wegen der zwangsläufig vorhandenen Streuung für eine Kalibrierung und ständige Kontrolle des Meßgerätes nicht geeignet. Er diente daher lediglich als Vergleichsmuster für einen ausgewählten Meßbereich, der für nachfolgende Messungen als Bezugsgröße verwendet werden kann.

Die Intensitätswerte wurden in diesen Untersuchungen als willkürliche Einheiten (A.U.) dargestellt, da die Fluoreszenzintensität einzelner Zellpopulationen nicht als physikalisch definierte Größe gemessen, sondern als relative Meßgröße durch das Gerät ausgegeben wird. Diese Relativierung der Meßgröße verlangt, daß alle unabhängigen Größen, wie z.B. Betriebsspannung und

Verstärkungsfaktor, genau vorgegeben und auch reproduziert werden können. Üblicherweise wird in der Fluorometrie von normierten Werten ausgegangen, d.h. von einer im Vergleich zu einem Standard prozentualen Stärke der Reaktion. Das setzt allerdings einen homogen und konstant fluoreszierenden Standard mit definierter Fluoreszenzintensität voraus, der in diesem Fall nicht zur Verfügung stand. Das hier verwendete Referenzmuster wies jedoch im Vergleich zu einem fluoreszierenden Zellpräparat mit nicht definierbaren biologischen Einflußgrößen nur geringe Schwankungen in der Fluoreszenzintensität auf.

Die statistischen Prüfverfahren haben gezeigt, daß während der Meßperiode unter konstanten apparativen und präparativen Bedingungen gemessen wurde.

In der Gegenüberstellung beider Verfahren erwiesen sich absorptionscytophotometrische Messungen von Einzelzellen in Bezug auf die Antikörperbindung differenzierender als mikrofluorometrische Verfahren.

Mit Hilfe der Absorptionsphotometrie konnte gezeigt werden, daß innerhalb einer Zellpopulation Unterschiede in der Expression zelleigener Antigene vorhanden waren, die sich in dem Produkt aus mittlerer Extinktion und der Bezugsfläche, dem relativen Maß der Menge gebundener Antikörper, um den Faktor 100 unterschieden. Dies lag im wesentlichen begründet in der Flächenbedeckung der mit Farbstoff kenntlich gemachten Antikörperbindung. Hier unterschieden sich Zellen, die Antigene auf 3 bis 4% der gesamten Fläche exprimierten, um den Faktor 25 von der Zelle mit der höchsten Antigenexpression, deren Oberfläche zu etwa 90% angefärbt war (Tab. 1). Die Lage von Antikörperbindungsstellen ließ sich außerdem im Rasterausdruck darstellen (Abb. 2).

Eine topographische Darstellung der Antigenverteilung mit fluorometrischen Methoden war dagegen nicht möglich. Unterschiede in der Antigenexpression können wegen der geringen Auflösung also nicht differenziert werden.

Die durch das Feinscanning erzielte hohe Auflösung bei Absorptionsmessungen bedingt jedoch einen hohen zeitlichen Aufwand, da bereits für das Messen und Auswerten von etwa 30 Einzelzellen 1 Stunde benötigt wurde.

Bei der durch eine unterschiedliche Antigenexpression der Zellen verursachten starken Streuung der Meßwerte einiger Präparate wären für eine gut abgesicherte Aussage sogar 200-300 Zellen nötig, um ein repräsentatives Maß für die Grundgesamtheit zu erhalten. Dieses kann mittels der statischen Methode nur durch Zellmessungen im Kollektiv mit vertretbarem Zeitaufwand erreicht werden. Kleine Stichproben sind bei nicht zufällig verteiltem Material für eine statistische Auswertung nicht ausreichend. So trafen zum Beispiel in zwei Stichproben von je 16 Einzelzellmessungen in der ersten 4 Zellen mit extrem schwacher Antikörperbindung auf, in der zweiten keine einzige. Auch bei zahlreichen fluorometrischen Messungen zeigte sich, daß im Verlauf der Messung eine Reihe von Zellen mit hoher Antigenexpression mit Zellen niedriger Antigenexpression abwechselten, eine Erscheinung, die mit statistischer Zufälligkeit nicht zu vereinbaren ist (Sachs, 1978).

Die Faktoren, die die fluorometrische Auswertung immunocytochemisch gefärbter Präparate darstellen, sind systematisch dargestellt, aber nicht gleichgewichtig behandelt, weil die Präparate und die Einflußgrößen mehr zufällig als systematisch nach Art eines

" Trial and Error " ausgewählt wurden. So ist zu erklären, daß einige vorgegebene Größen (unabhängige Variablen) wie Einzelzell- und Mehrzellen-Scanning, Passagestadium, Fixierung und der Meßumfang der jeweils verwendeten Antikörper nicht in gleichem Umfang bearbeitet wurden.

## 2. Immunocytochemische und cytophotometrische Analyse

Aus den vorliegenden Ergebnissen wurde offensichtlich, daß eine variable Anzahl von Zellen bei Gliomen des Menschen und den daraus etablierten Zelllinien von monoklonalen Antikörpern nicht erkannt wurde. Die auf einem unterschiedlichen Grad gebundener Antikörpermoleküle je Zelle beruhende Fluoreszenzintensität war sowohl innerhalb in vitro etablierter Gliome als auch unter einzelnen Gliomzelllinien unterschiedlich und durch zum Teil hohe Streuungen gekennzeichnet.

Über die Heterogenität hinsichtlich der Antigenexpression bei einer Gliomkultur des Menschen unter Verwendung monoklonaler Antikörper berichteten Wikstrand et al. (1983). Dieses immunologische Abweichen einzelner Gliomzellpopulationen innerhalb desselben Tumors ist besonders in therapeutischer Hinsicht von Interesse, da antigennegative Zellpopulationen einer spezifischen Immunreaktion entgehen können. Aufgrund der unterschiedlichen Expression von Antigenen im Tumorgewebe dürfte es nicht möglich sein, mittels eines einzigen monoklonalen Antikörpers eine vollständige Zellmarkierung zu erzielen, da häufig ein bestimmter Anteil von Tumorzellen von dem Antikörper nicht erkannt wird. Durch den kombinierten Einsatz mehrerer monoklonaler Antikörper, die verschiedene Determinanten an der Oberfläche oder im Cytoplasma von Gliomzellen erkennen, könnte möglicherweise die Erkennungsrate wesentlich erhöht werden.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Antigenexpression könnte sein, daß tumorassoziierte Antigene in Abhängigkeit von Zelldifferenzierung bzw. Zellzyklusphasen exprimiert werden. Unter dieser Voraussetzung würde man bei den hier verwendeten unklonierten und asynchronen Zellpopulationen eine Heterogenität erwarten. Den Nachweis einer zellzyklusabhängigen Antigenexpression brachten die Untersuchungen von Burchiel et al. (1982) und Leong et al. (1987) an in vitro propagierten Melanomen mittels monoklonaler Antikörper. Die antigen-negative Fraktion der Tumorzellen war dabei auf die G0/G1-Phase des Zellzyklus beschränkt. Der Anteil antigenpositiver Zellen war in den ersten Tagen der Subkultivierung höher als in späteren Passagestadien und steht damit in Widerspruch zu einigen Fällen der vorliegenden Untersuchungen. Der Effekt einer steigenden Erkennungsrate in Verbindung mit steigender Bindungsaffinität konnte mit Hilfe des Antikörpers MUC 2-63 bei steigenden Passagen der Gliomzelllinien 87HG-31 bzw. 87HG-35 beobachtet werden. Einen höheren Erkennungsgrad mit steigender Passage zeigte auch MUC 8-22 innerhalb der permanenten Glioblastomzelllinie 85HG-65. Eine fallende Tendenz in der Erkennungsrate mit höherer Passage bestand dagegen für MUC 8-22 innerhalb einer permanenten Astrozytomzelllinie 85HG-63. Ferner zeigte MUC 2-63 eine

erhöhte Bindungsfähigkeit ab der 28. Passage der Glioblastomlinie 86HG-39 und ab der 176. Passage der Glioblastom-Sarkomlinie 85HG-59. Aus den Ergebnissen war weiterhin ersichtlich, daß Zellen eines Primärtumors im Vergleich zu permanenten Zelllinien zu einem viel geringeren Prozentsatz erkannt wurden.

Die hier beobachtete antigene Drift mit abnehmender oder zunehmender Antigenexpression während steigender *in vitro* Zellpassagen steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen an einem humanen Mammacarcinom (Capone et al., 1984; Hand et al., 1983). Als Ursache für diese Erscheinung müssen genetische und umweltbedingte bzw. epigenetische Faktoren in Erwägung gezogen werden (Heppner, 1984). Neben der Überzeugung, daß Tumorzellen genetisch instabil sind (Nowell, 1976) und endogene Strukturveränderungen innerhalb des Zellgenoms Heterogenität bewirken, wurden von verschiedenen Autoren äußere Einflüsse und nicht erbliche Faktoren dafür verantwortlich gemacht (Honsik u. Olsson, 1982; Honsik et al., 1986, Edwards, 1985).

Studien an genetisch identischen Zellen eines Tumorzellklones durch Taupier et al. (1983) zeigten nämlich deutliche Unterschiede in der Antigenexpression, die unabhängig vom Zellzyklus waren, und die spontan und ohne erkennbare äußere Einflüsse auftraten.

Die Tatsache, daß auch äußere Einflüsse für die Antigenexpression eine Rolle spielen können, geht aus den Untersuchungen von Sorg et al. (1978) an *in vitro* etablierten Zellen eines humanen Melanoms hervor. Dabei hatte die Zusammensetzung des Kultivationsmediums einen direkten Einfluß auf die quantitative und qualitative Antigenexpression. Im Vergleich hierzu zeigte sich unter standardisierten *in vitro* Bedingungen das Antigenprofil humaner Gliomzellen stabil (Wikstrand et al., 1983). In diesem Zusammenhang wurden Wechselwirkungen zwischen bestehenden Subpopulationen eines malignen Tumors, die das Ausmaß der Entstehung neuer Varianten mit neuen Eigenschaften beeinflussen, angenommen (Poste u. Greig, 1983). Epigenetische Faktoren als Selektionsdruck könnten einen direkten Einfluß auf die Zahl der Subpopulationen und das Ausmaß der Phänotypenänderungen haben (Heppner, 1984).

Milieubedingte Veränderungen in der Expression antigener Strukturen in Verbindung mit einem Anpassungsprozeß *in vitro* und *in vivo* könnten ebenfalls eine Erklärung für die höhere Erkennungsrate von Tumorzellen durch monoklonale Antikörper sein. Die aufgeführten Beobachtungen sind nicht nur zellbiologisch von Bedeutung, sondern ebenso für die Frage nach einer Vergleichbarkeit von Tumorzellen, die über lange Zeit *in vitro* gezüchtet wurden, mit den Zellen des Ursprungstumors.

Der weite Bereich der antigenen Diversifikation von Gliomzelllinien kann einerseits das Ergebnis einer Antigenvereinfachung mit der Zeit (McLean et al., 1982; Lampson u. Levy, 1980) oder andererseits auf einer Selektion beruhen. Ferner könnte die *in vitro* Etablierung relativ antigenarmer oder antigennegativer Zellen, d.h. die Gewinnung von Zellvarianten mit einem Wachstumsvorteil unter veränderten Wachstumsbedingungen, ebenso von Bedeutung sein (Wikstrand et al., 1985). Innerhalb derselben Tumorzellpopulation mag eine unterschiedliche Antigenexpression auf einem Zusammenwirken von Zellzyklus und klonaler Variabilität infolge eines Anpassungs- oder Selektionsprozesses *in vitro* begründet sein.

Die Beurteilung der Bindungsfähigkeit der monoklonalen Antikörper auf der Ebene von Einzelzellen zeigte, daß sowohl intrazelluläre als auch membranassoziierte Antigene erkannt wurden (Abb. 5a-d). Intrazelluläre Antigene ließen sich durch Verwendung fixierter Zellen immunocytochemisch darstellen. In den vorliegenden Messungen war ein Einfluß der Fixierung insofern gegeben, als MUC 8-22 eine signifikant schwächere Bindung an native Zellen zeigte, während bei Verwendung von MUC 2-63 mit wenigen Ausnahmen (85HG-59, 85HG-65) kein Einfluß der Fixierung auf die Erkennungsrate gegeben war. Im Allgemeinen schien jedoch die gemessene Fluoreszenzintensität bei fixierten Zellen im Vergleich zu nativem Material um 10 bis 20% niedriger zu liegen. Auf den Umstand, daß die Art der Fixierung maßgeblich die Reaktivität und damit Darstellbarkeit selektiv gebundener monoklonaler Antikörper beeinflußt, wurde wiederholt hingewiesen (Van Ewijk et al., 1980; Judd u. Britten, 1982; Walker et al., 1984).

## F. ZUSAMMENFASSUNG

Das Antigenprofil von Gliomen des Menschen und den daraus *in vitro* propagierten Zelllinien wurde durch Bindungsstudien mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern (MUC 8-22, MUC 14-22, MUC 2-63 und W6/32) dargestellt.

Die Immunocytochemische Analyse von Zelloberflächenantigenen mittels indirekter Immunfluoreszenz führt dabei, je nach Grad spezifisch gebundener Antikörper, zu einem fluoreszierenden Reaktionsprodukt, dessen Intensität und Verteilung durch computerunterstützte Scanning-Cytofluorometrie gemessen wurde.

Der Anteil immunreaktiver Zellen in Cytospin-Präparationen wurde durch Kernfärbung mit Propidiumjodid erfaßt. Hierbei zeigte sich, daß ein variabler Prozentsatz von Zellen mit den monoklonalen Antikörpern nicht reagierte. Darüberhinaus wies die Erkennungsrate der jeweiligen Antikörper auf signifikante Unterschiede in verschiedenen Zellpassagestadien einer Tumorzelllinie hin. Sowohl innerhalb *in vitro* etablierter Gliome als auch unter einzelnen Gliomzelllinien war ein unterschiedlicher Bindungsgrad der monoklonalen Antikörper meßbar. Die Höhe der Streuung in den Intensitätswerten war innerhalb der Zellpopulationen unterschiedlich und beruhte auf der antigenen Heterogenität der Tumorzellen.

Die Reproduzierbarkeit der Messungen wurde über einen Zeitraum von vier Monaten bestätigt und beweist die Zuverlässigkeit dieser Meßmethode.

An Beispielen wurde gezeigt, daß es prinzipiell auch möglich ist, die Bindungsreaktion von monoklonalen Antikörpern an einzelne Gliomzellen mittels indirekter Immunperoxidase photometrisch zu messen. Durch Messung der Absorption von einzelnen Gliomzellen nach Immunperoxidase-Färbung ließ sich die relative Konzentration gebundener Antikörper und damit indirekt die vorliegende Antigendichte ermitteln.

Beide Meßverfahren wurden letztlich entwickelt, um eine objektivierbare, reproduzierbare und möglichst quantitative Aussage über die Bindung von monoklonalen Antikörpern an Gliomzellen zu erhalten. Auf diese Weise könnte die Objektivierung der Dignität neurogener Tumoren verbessert werden.

## Summary

### Immunocytochemical and scanning-photometrical analysis of human gliomas by monoclonal antibodies.

The antigenic profile of human gliomas and in vitro established cell lines was investigated by using selected monoclonal antibodies (MUC 8-22, MUC 14-22, MUC 2-63, W6/32).

According to the degree of antibody binding the immunocytochemical analysis of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence resulted in a fluorescent reaction product which intensity and distribution was measured by computer-assisted cytofluorometry.

Using Propidium Iodide as a nuclear counterstain the proportion of immunoreactive cells in cytopsin-preparations was determined by the two wavelength method. The data suggests that a variable percentage of cells was not recognized by the employed monoclonal antibodies. Moreover, the reactivity spectrum of selected antibodies showed significant difference in various stages of subcultivation of glioma lines. A various degree of antibody binding among and within glioma cell lines could be measured.

The extent of variance in intensity values was different within cell populations and reflected the antigenic heterogeneity common to tumor cells. The reliability of the present method could be established by high reproducibility over a period of four months.

In comparison it has been shown that cytophotometric techniques based on the detection of antibody binding by immunoperoxidase techniques could in principle provide a means to quantitate antibody binding to individual cells. By measuring the absorbance of the reaction product it is possible to determine the relative amount of bound antibodies and the present antigenic density. Both techniques have been developed to permit an objective, reproducible and quantitative evaluation of relative binding of monoclonal antibodies to gliomas. By this means the objective evaluation of neurogenic tumors could be improved.

---

Mit finanzieller Unterstützung der Wilhelm Sander-Stiftung (Sta - 86.005.1) und des C. Bohneward-Fonds für Krebsforschung, Universität München, durchgeführt.

**Q. LITERATURÜBERSICHT**

Allison, D. C., Roldolpho, P. F., Rasch, E. M., Rasch, R. W., Johnson, T. S.: Increased accuracy of absorption cytophotometric DNA-Values by control of stain intensity.  
J. Histochem. Cytochem. **29**, 1219-1228 (1981)

Ashihara, T., Kamachi, M., Urata, Y., Kusuzaki, K., Takeshita, H., Kagawa, K.: Multiparametric analysis using autostage cytofluorometry.  
Acta Histochem. Cytochem. **19**, 51-59 (1986)

Bengtsson, E., Holmqvist, J., Olsen, B., Stenkvist, B.: SCANCANS-An interactive scanning cell analysis system.  
Comput. Programs In biomed. **6**, 39-49 (1976)

Bigner, D. D., Bigner, S. H., Westermarck, B., Mahaley, M. S., Ruoslahti, E., Herschman, H., Eng, L. F., Wikstrand, C. J.: Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. **40**, 201-229 (1981)

Bilzer, Th., Stavrou, D., Dahme, E., Anzil, A.P.: Cell-mediated immune response in rats immunized with chemically modified syngeneic glioma cells. Monitoring by in vivo parameters and in vitro immune cytolysis.  
Anticancer Res. **2**, 345-354 (1982)

Bjelkenkrantz, K., Stal, O., Gröntoft, O., Olofsson, J., Herder, A., Hellquist, H.: HISTOSCAN: Computer Program for cytophotometry in tissue sections and its application in the evaluation of nuclear atypia.  
Histochemistry **73**, 355-362 (1981)

Bjelkenkrantz, K., Stal, O., Gröntoft, O.: A fast and reliable system for microcomputerized DNA cytofluorometry in tumor pathology.  
Histochemistry **79**, 145-155 (1983)

Böhm, N., Sprenger, E.: Fluorescence cytophotometry: A valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA.  
Histochemie **16**, 100-118 (1968)

Bonner, W. A., Hulett, H. R., Sweet, R. G., Herzenberg, L. A.: Fluorescence activated cell sorting.  
Rev. Sci. Instrum. **43**, 404 (1972)

Bullard, D. E., Bigner, D. D.: Applications of monoclonal antibodies in the diagnosis and treatment of primary brain tumors.  
J. Neurosurg. **63**, 2-16 (1985)

Bullard, D. E., Schold, S. C., Bigner, S. H., Bigner, D. D.: Growth and chemotherapeutic response in athymic mice of tumors arising from human glioma-derived cell lines.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. **40**, 410-427 (1981)

Burchiel, S. W., Martin, J. C., Imai, K., Ferrone, S., Warner, N. L.: Heterogeneity of HLA-A, B, Ia like, and melanoma-associated antigen expression by human melanoma cell lines analyzed with monoclonal antibodies and flow cytometry.  
Cancer Res. **42**, 4110-4115 (1982)

Byers, V. S., Johnston, J. O.: Antigenic differences among osteogenic sarcoma tumor cells taken from different locations in human tumors.  
Cancer Res. **37**, 3173-3183 (1977)

Calncross, J. G., Mattes, M. J., Beresford, H. R., Albino, A. P., Houghton, A. N., Lloyd, K. O., Old, L. J.: Cell surface antigens of human astrocytoma defined by mouse monoclonal antibodies: Identification of astrocytoma subsets.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **79**, 5641-5645 (1982)

- Capone, P. M., Papsidero, L. D., Chu, T. M.: Relationships between antigen density and immunotherapeutic response elicited by monoclonal antibodies against solid tumors.  
J. Natl. Cancer Inst. **72**, 673-677 (1984)
- Carrel, S., de Tribolet, N., Mach, J. P.: Expression of neuroectodermal antigens common to melanomas, gliomas and neuroblastomas.  
Acta Neuropathol. **57**, 158-164 (1982)
- Caspersson, T.: Die Untersuchung der Nukleinsäureverteilung im Zellkern.  
Z. wiss. Mikr. **53**, 403-419 (1936)
- Ciocca, D. R., Bjercke, R. J.: Immunohistochemical techniques using monoclonal antibodies.  
Meth. in Enzymol. **121**: 526-579 (1986)
- Coakham, H. B.: Immunology of brain tumors.  
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. **20**, 145-149 (1984)
- Coakham, H. B., Kornblith, P. L., Quindlen, E. A., Pollock, L. A., Wood, W. C., Hartnett, L. C.: Autologous humoral response to human gliomas and analysis of certain cell surface antigens: In vitro study with the use of microcytotoxicity and immune adherence assays.  
J. Nat. Canc. Inst. **64**, 223-233 (1980)
- Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.  
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) **47**, 200-202 (1941)
- Coons, A. H., Kaplan, M. H.: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.  
J. Exp. Med. **91**, 1-13 (1950)
- Cowell, J. K., Franks, L. M.: A rapid method for accurate DNA measurements in single cells in situ using a simple microfluorimeter and Hoechst 33258 as a quantitative fluorochrome.  
J. Histochem. Cytochem. **28**, 206-210 (1980)
- Dippold, W. G., Lloyd, K. O., Li, L. T. C., Ikeda, H., Oettgen, H. F., Old, L. J.: Cell surface antigens of human malignant melanoma: Definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **77**, 6114-6118 (1980)
- Diserens, A. C., de Tribolet, N., Martin-Archad, A., Gaide, A. C., Schnegg, F., Carrel, S.: Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18.  
Acta Neuropathol. **53**, 21-28 (1981)
- Dittrich, W., Göhde, W.: Impulsfluorometrie bei Einzelzellen in Suspensionen.  
Z. Naturforsch. **24b**, 360-361 (1969)
- Donovan, R. M., Goldstein, E.: A charge coupled device-based image cytophotometry system for quantitative histochemistry and cytochemistry.  
J. Histochem. Cytochem. **33**, 551-556 (1985)
- Duijndam, W. A., Smeulders, A. W. M., Van Duijn, P., Verweij, A. C.: Optical errors in scanning stage absorbance cytophotometry. I. Procedures for correcting apparent integrated absorbance values for distributional, glare and diffraction errors.  
J. Histochem. Cytochem. **28**, 388-394 (1980a)
- Duijndam, W. A., Van Duijn, P., Riddersma, S. H.: Optical errors in scanning stage absorbance cytophotometry. II. Application of correction factors for residual distributional error, glare and diffraction error in practical cytophotometry.  
J. Histochem. Cytochem. **28**, 395-400 (1980b)

- Edwards, P. A. W.: Heterogeneous expression of cell-surface antigens in normal epithelia and their tumours, revealed by monoclonal antibodies.  
Br. J. Cancer **51**, 149-160 (1985)
- Enerbäck, L., Johansson, K.-A.: Fluorescence fading in quantitative fluorescence microscopy: A cytofluorometer for the automatic recording of fluorescence peaks of very short duration.  
Histochem. J. **5**, 351-362 (1973)
- Frost, P., Kerbel, R.: On a possible mechanism(s) of tumor cell heterogeneity.  
Cancer Met. Rev. **2**, 375-378 (1983)
- Fukuda, M., Böhm, N., Fujita, S.: Cytophotometry and its biological application.  
Prog. Histochem. Cytochem. **11**, 1-12 (1978)
- Fukuda, M., Kazumasa, H., Masayuki, N., Morita, T.: A fluorescence cytophotometer operated under computer control for multi-parameter cell analysis.  
Histochemistry **76**, 1-13 (1982)
- Fukuda, M., Nakanishi, K., Fujita, S.: Multi-colour fluorescence method in cytofluorometry.  
Acta histochem. Cytochem. **12**, 257-272 (1979)
- Fukuda, M.: Application of the microcomputer in multiparametric fluorescence cytophotometry.  
J. Histochem. Cytochem. **31**, 241-243 (1983)
- Goldman, M.: An improved microfluorimeter for measuring brightness of fluorescent antibody reactions.  
J. Histochem. Cytochem. **15**, 38-45 (1967)
- Goldman, M., Carver, R. K.: Microfluorometry of cells stained with fluorescent antibody.  
Exp. Cell Res. **23**, 265-271 (1961)
- Ghosh, A. K., Spriggs, A. I., Taylor-Papadimitriou, J., Mason, D. Y.: Immunocytochemical staining of cell in pleural and peritoneal effusions with a panel of monoclonal antibodies.  
J. Clin. Pathol. **36**, 1154-1164 (1983)
- Graham, R. C., Karnovsky, M. J.: The early stages of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique.  
J. Histochem. Cytochem. **14**, 291 (1966)
- Graham, R. C., Lundholm, U., Karnovsky, M. J.: Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-ethyl-carbazole.  
J. Histochem. Cytochem. **13**, 150-152 (1965)
- Haalijman, J. J.: Labelling of proteins with fluorescent dyes: Quantitative aspects of immunofluorescence microscopy.  
In: Cuellar, A. C. (Ed.): Immunohistochemistry.  
John Wiley & Sons, Chichester/ New York/ Brisbane/ Toronto/ Singapur, 1984, pp. 47-85
- Haalijman, J. J., Van Dalen, J. P. R.: Quantification in immunofluorescence microscopy. A new standard for Fluorescein and Rhodamine emission measurement.  
J. Immunol. Meth. **5**, 357-374 (1974)
- Hand, P. H., Nutt, M., Colcher, D., Schlom, J.: Definition of antigenic heterogeneity and modulation among human mammary carcinoma cell populations using monoclonal antibodies to tumor-associated antigens.  
Cancer Res. **43**, 728-735 (1983)
- Hall, T. L., Fu, Y. S.: Biology of disease. Applications of quantitative microscopy in tumor pathology.  
Lab. Invest. **53**, 5-21 (1985)
- Heppner, G.: Tumor heterogeneity.  
Cancer Res. **44**: 2259-2265 (1984)

Holborow, E. J., Johnson, G. D., Chantler, S: Use of international reference preparations for immunofluorescence.

In: Wick, G., Holborow, E. J., Schauenstein, K. (Eds): Immunofluorescence technology. Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1982, pp. 37- 49

Holmquist, J., Bengtsson, E., Eriksson, O., Stenkvist, B.: A program for interactive measurements on digitized cell images.

J. Histochem. Cytochem. **25**, 641-654 (1977)

Honsik, C. J., Diamant, M., Olsson, L.: Generation of stable cellular phenotypes in a human malignant cell line conditioned by alterations in the cellular microenvironment.

Cancer Res. **46**, 940-949 (1986)

Honsik, C.J., Olsson, L.: Phenotypic heterogeneity of malignant tumors as revealed by monoclonal antibodies.

Invasion Metastasis **2**, 249-259 (1982)

Imal, K., Ng, A.-K., Ferrone, S.: Characterization of monoclonal antibodies to human melanoma-associated antigens.

J. Nat. Canc. Inst. **66**, 489-496 (1981)

James, J.: Developments in photometric techniques in static and flow systems from 1960 to 1980: A review, including some personal observations.

Histochem. J. **15**, 95-110 (1983)

Johnson, G. D., Araujo, G. M. de C. Nogueira: A simple method of reducing fading of immunofluorescence during microscopy.

J. Immunol. Meth. **43**, 349-350 (1981)

Johnson, G. D., Davidson, R. S., McNamee, K. C., Russell, G., Goodwin, D., Holborow, E. J.: Fading of immunofluorescence during microscopy: A study of the phenomenon and its remedy.

J. Immunol. Meth. **55**, 231-242 (1982)

Jones, K. H., Kniss, D. A.: Propidium iodide as a nuclear counterstain for immunofluorescence studies on cells in culture.

J. Histochem. Cytochem. **35**, 123-125 (1987)

De Jong, A. S. H., Van Kessel-van Vark, M., Raap, A. K.: Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry.

Histochem. J. **17**, 1119-1130 (1985)

Jongsma, P. M., Hijmans, W., Ploem, J. S.: Quantitative Immunofluorescence.

Histochemie **25**, 329-343 (1971)

Judd, M. A., Britten, K. J. M.: Tissue preparation for the demonstration of surface antigens by immunoperoxidase techniques.

Histochem. J. **14**, 747-753 (1982)

Kawamura, A., Aoyama, Y.: Immunofluorescence in medical science.

University of Tokyo Press, Springer Verlag, 1983

Kemshead, J. T., Fritschy, J., Asser, U., Sutherland, R., Greaves, M. F.: Monoclonal antibodies defining markers with apparent selectivity for particular haemopoietic cell types may also detect antigen on cells of neural crest origin.

Hybridoma **1**, 109-123 (1982)

Kendal, W. S., Frost, P.: Genetic instability and tumor progression.

Pathol. Immunopathol. Res. **5**, 455-467 (1986)

Kennet, R. H., Gilbert, F.: Hybrid myelomas producing antibodies against neuroblastoma antigen present on fetal brain.

Science **203**, 1120-1121 (1979)

Kim, S. U., Morello, G., Shln, D. H.: Expression of Ia Antigens on the surface of human oligodendrocytes and astrocytes in culture.  
J. Neuroimmunol. **10**, 141-149 (1985)

Knapp, W.: Preparation and use of defined antigenic substrates for standardized immunofluorescence.

In: Wick, G., Holborow, E. J., Schauenstein, K. (Eds): Immunofluorescence technology. Selected theoretical and clinical aspects.  
Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1982, pp. 11-25

Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity.  
Nature **256**, 495-497 (1975)

Koprowski, H., Steplewski, Z., Herlyn, D., Herlyn, M.: Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids.  
Proc. Nat. Aca. Sci. USA **75**, 3405-3409 (1978)

Laerum, O. D., Mork, S. J., Rajewsky, M. S., Hansteen, I. L., Haugen, A.: Heterogeneity and selection of neoplastic neurogenic rat cells in vivo and in vitro.  
Anticancer Res. **3**, 187-194 (1983)

Lampson, L. A., Levy, R.: Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line.  
J. Immunol. **125**, 293-299 (1980)

Leong, S. P. L., Noguchi, P. D., Cunningham, R. E., Takami, T., Roth, J. A.: Heterogeneous expression of a murine B16 melanoma-associated antigen correlates with cell cycle.  
Cancer Immunol. Immunother. **24**, 106-112 (1987)

Mansberg, H. P., Kusnetz, J.: Quantitative fluorescence microscopy: Fluorescent antibody automatic scanning techniques.  
J. Histochem. Cytochem. **14**, 260-273 (1966)

McKeever, P. E., Hood, T. W., Verani, J., Taren, J. A., Belerwalles, W. H., Wahl, R., Liebert, M., Nguyen, P. K.: Products of cells cultured from gliomas. V. Cytology and morphometry of two cell types cultured from glioma.  
J. Natl. Cancer Inst. **78**, 75-84 (1987)

MacLean, G. D., Seehafer, J., Shaw, A. R. E., Kieran, M. W., Longenecker, M.: Antigenic heterogeneity of human colorectal cancer cell lines analyzed by a panel of monoclonal antibodies. I. Heterogeneous expression of Ia-like and HLA-like antigenic determinants.  
J. Natl. Cancer Inst. **69**, 357-364 (1982)

McComb, R. D., Wikstrand, C. J., Bourdon, M. A., Bigner, S. H., Bigner, D. D.: Antigenic heterogeneity of human malignant gliomas demonstrated by reactivity with 10 monoclonal antibodies.  
J. Neuropath. Exp. Neurol. **42**, 308 (1984)

Melamed, M. R., Kamentsky, L. A.: Automated cytology.  
Internat. Rev. Exp. Pathol. **14**, 205-295 (1975)

Mork, S. J., Laerum, O. D.: Modal DNA content of human intracranial neoplasms studied in flow cytometry.  
J. Neurosurg. **53**, 198-204 (1980)

De Muralt, B., de Tribolet, N., Diserens, A. C., Stavrou, D., Mach, J. P., Carrel, S., Phenotyping of 60 cultured human gliomas and 34 other neuroectodermal tumors by means of monoclonal antibodies against glioma, melanoma and HLA-DR antigens.  
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. **21**, 207-216 (1985)

Nairn, R. C.: Standardization in immunofluorescence.  
Clin. Exp. Immunol. **3**, 465-476 (1968)

- Nakane, P. K., Pierce, G. B.: Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens.  
J. Histochem. Cytochem. **11**, 929-931 (1967)
- Nibbering, P. H., Leljh, P. C. J., Van Furth, R.: A cytophotometric method to quantitate the binding of monoclonal antibodies to individual cells.  
J. Histochem. Cytochem. **33**, 453-459 (1985)
- Nowell, P.: The clonal evolution of tumor cell populations.  
Acquired genetic lability permits stepwise selections of variant sublines and underlies tumor progression.  
Science **194**, 23-28 (1976)
- Nowell, P. C.: Tumors as clonal proliferation.  
Virchows Arch. B Cell Path. **29**, 145-150 (1978)
- Ockleford, C. D., Hsi, B.-L., Wakely, J., Badley, R. A., Whyte, A., Faulk, W. P.: Prodigium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. I. Use with tissue and cytoskeleton studies.  
J. Immunol. Meth. **43**, 261-267 (1981)
- Olsson, L.: Phenotypic diversity of malignant cell populations: Molecular mechanisms and biological significance.  
Cancer Rev. **3**, 91-114 (1986)
- Paul, J.: Zell-und Gewebekulturen.  
De Gruyter, New York/Berlin, 1980
- Petrusz, P.: Essential requirements for the validity of immunocytochemical staining procedures.  
J. Histochem. Cytochem. **31**, 177-179 (1983)
- Piller, H.: Microscope photometry.  
Springer Verlag, Heidelberg/ New York, 1977
- Ploem, J. S.: Appropriate technology for the quantitative assessment of the final reaction product of histochemical techniques.  
In: Trends in enzyme histochemistry and cytochemistry.  
CIBA Foundation Symposium 73, Excerpta medica Amsterdam, 1980
- Ploem, J. S., DeSterke, J. A., Bonnet, J., Wasmud, H.: A microspectrofluorometer with epi-illumination operated under computer control.  
J. Histochem. Cytochem. **22**, 668-677 (1974)
- Ploem, J. S.: Automated methods in immunofluorescence studies.  
In: Wick, G., Holborow, E. J., Schauenstein, K. (Eds): Immunofluorescence technology.  
Elsevier North-Holland biomedical Press, Amsterdam, 1982, pp. 72-93
- Poduslo, S. E., Miller, K., Jang, Y.: Comparison of lipids and lipid metabolism in a human glioma cell line, its clone, and oligodendroglia.  
Cancer Res. **43**, 1014-1018 (1983)
- Poncelet, P., Carayon, P.: Cytofluorometric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies.  
J. Immunol. Meth. **85**, 65-74 (1985)
- Poste, G., Grelg, R.: The experimental and clinical implications of cellular heterogeneity in malignant tumors.  
J. Cancer Res. Clin. Oncol. **106**, 159-170 (1983)
- Prenna, G., Mazzini, G., Cova, S.: Methodological and instrumental aspects of cytofluorometry.  
Histochem. J. **6**, 259-278 (1974)
- Rasch, E. M., Rasch, R. W.: Applications of microcomputer technology to cytophotometry.  
J. Histochem. Cytochem. **27**, 1384-1387 (1979)

- Ruch, F.: Principles and some applications of cytofluorometry.  
In: Wied, G.L., Bahr, G.F. (Eds): Introduction to quantitative cytochemistry II.  
Academic Press, New York /London, 1970, pp. 431-450
- Ruch, F., Leeman, U.: Cytofluorometry.  
In: Neuhoff, V. (Ed.): Molecular biology, biochemistry and biophysics Vol. 14. Micromethods in molecular biology.  
Springer Verlag, Berlin/ Heidelberg/ New York, 1973, pp. 329-346
- Rundquist, I.: A flexible system for microscope fluorometry served by a personal computer.  
Histochemistry **70**, 151- 159 (1981)
- Sachs, L.: Angewandte Statistik.  
Springer Verlag, Berlin/ Heidelberg/ New York, 1978
- Schauenstein, K., Wick, G.: Membrane Immunofluorescence.  
In: Wick, G., Holborow, E. J., Schauenstein, K. (Eds ): Immunofluorescence technology. Selected theoretical and clinical aspects.  
Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1982, pp. 37-49
- Schiffner, D., Giordana, M. T., Germano, I., Mauro, A.: Anaplasia and heterogeneity of GFAP expression in gliomas.  
Tumori **72**, 163-170 (1986)
- Schnegg, J. F., Diserens, A. C., Carrel, S., Accola, R. S., de Tribolet, N.: Human Glioma-associated antigens detected by monoclonal antibodies.  
Cancer Res. **41**, 1209-1213 (1981b)
- Schnegg, J. F., de Tribolet, N., Diserens, A. C., Martin-Achard, A., Carrel, S.: Characterization of a rabbit anti-human malignant glioma antiserum.  
Int. J. Cancer **28**, 265-269 (1981a)
- Schold, S. C., Bigner, D. D.: Treatment of five subcutaneous human glioma tumor lines in athymic mice with Carmustine, Procarbazine, and Mithramycin.  
Cancer Treat. Rep. **67**, 811-819 (1983)
- Seeger, R. C., Rosenblatt, H. M., Imal, K., Ferrone, S.: Common antigenic determinants on human melanoma, glioma, neuroblastoma, and sarcoma cells defined with monoclonal antibodies.  
Cancer Res. **41**, 2714-2717 (1981)
- Shapiro, J.R., Shapiro, W. R.: The subpopulations and isolated cell types of freshly selected high grade human gliomas. Their influence on the tumors evolution in vivo and behavior and therapy in vitro.  
Cancer Metast. Revs. **4**, 107-124 (1985)
- Shapiro, J. R., Yung, W. A., Basler, G. A., Shapiro, J. R.: Heterogeneous response to chemotherapy of human gliomas grown in nude mice and as clones in vitro.  
Cancer Treat. Rep. **65**, 55-59 (1981b)
- Shapiro, J. R., Yung, W. A., Shapiro, W. R.: Isolation, Karyotype, and clonal growth of heterogeneous subpopulations of human malignant gliomas.  
Cancer Res. **41**, 1359-2349 (1981a)
- Sorg, C., Brügggen, J., Selbert, E., Macher, E.: Membrane-associated antigens of human malignant melanoma IV: Changes in expression of antigens on cultured melanoma cells.  
Cancer Immunol. Immunother. **3**, 259-271 (1978)
- Stavrou, D., Anzil, A. P., Elling, H.: Tumor specific fluorescent and complement-dependent cytotoxic antibodies in the serum of rats with chemically induced brain gliomas.  
Acta Neuropathol. **43**, 111-117 (1978)

Stavrou, D., Bilzer, Th., Hulten, M., Zänker, K. S., Anzil, A. P., Haglid, K. G., Dahme, E.: Immunological aspects of experimental brain tumors.  
Anticancer Res. **2**, 151-156 (1982)

Stavrou, D., Kelditsch, E., Schmidberger, F., Bise, K., Funke, I., Eisenmenger, W., Kurrle, R., Martin, B., Stocker, U.: Monoclonal antibodies against human astrocytomas and their reactivity pattern.  
J. Neurol. Sci. **80**, 205-220 (1987)

Stavrou, D., Süß, C., Bilzer, T., Kummer, U., de Tibolet, N.: Monoclonal antibodies reactive with glioma cell lines from experimental brain tumors.  
Eur. J. Cancer clin. Oncol. **19**, 1439 (1983)

Stavrou, D., Hulten, M., Anzil, A. P., Bilzer, T.: The humoral response of rats immunized with chemically modified syngeneic brain cells and glioma cells.  
Int. J. Cancer **26**, 629-637 (1980)

Stavrou, D., Süß, C., Bilzer, T., Kummer, U., de Tribolet, N.: Glioma associated antigens detected by monoclonal antibodies.  
Anticancer Res. **4**, Suppl.1, 15-18 (1984)

Stęplewski, Z., Herlyn, M., Herlyn, D., Clark, W. H., Koprowski, H.: Reactivity of monoclonal anti-melanoma antibodies with melanoma cells freshly isolated from primary and metastatic melanoma.  
Eur. J. Immunol. **9**, 94-99 (1979)

Storz, H.: Investigations of fading of immunofluorescence objects.  
Acta Histochem. **71**, 2-9 (1982)

Storz, H., Jelke, E.: Photomicrography of weakly fluorescent objects. Employment of p-Phenylen-diamin as a blocker of fading.  
Acta Histochem. **75**, 133-139 (1984)

Streefkerk, J. G., Van der Ploeg, M.: Quantitative aspects of cytochemical peroxidase procedures investigated in a model system.  
J. Histochem. Cytochem. **21**, 715-722 (1973)

Streefkerk, J. G., Van der Ploeg, M., Van Duijn, P.: Agarose beads as matrices for proteins in cytophotometric investigations of immunoperoxidase procedures.  
J. Histochem. Cytochem. **23**, 243-250 (1975)

Taupler, M. A., Kearney, J. F., Leibson, P. J., Loken, M. R., Schreiber, H.: Nonrandom escape of tumor cells from immune lysis due to intraclonal fluctuations in antigen expression.  
Cancer Res. **43**, 4050-4056 (1983)

de Tribolet, N., Carrel, S.: Human glioma tumor-associated antigens.  
Cancer Immunol. Immunother. **9**, 207-211 (1980)

Van Duijn, P.: Prospects for microscopical cytochemistry.  
Histochem. J. **8**, 553-676 (1976)

Van Ewijk, W., Coffman, R. C., Weissman, I. L.: Immunelectron microscopy of cell surface antigens: A quantitative analysis of antibody binding after different fixation protocols.  
Histochem. J. **12**, 349-359 (1980)

Van der Ploeg, M., Van den Broek, K., Smeulders, A. W. M., Vossepoel, A. M., Van Duijn, P.: HIDACSYS: Computer Programs for Interactive scanning cytophotometry.  
Histochemistry **54**, 273-288 (1977)

Walker, W. S., Beelen, R. H. J., Buckley, P. J., Melvin, S. L., Yen, S. E.: Some fixation of reagents reduce or abolish the detectability of Ia-antigen and HLA-DR on cells.  
J. Immunol. Meth. **67**, 89-101 (1984)

Warweg, U., Körting, H. J.: Einfluß von Einbettungsmitteln auf den Ausbleicheffekt von FITC-markierten Deckglaspräparaten.  
Microscopica Acta **85**, 7-10 (1981)

Wikstrand, C. J., Bigner, D. D.: Surface antigens of human glioma cells shared with normal and fetal brain.  
Cancer Res. **39**, 3235-3243 (1979)

Wikstrand, C. J., Bigner, D. D.: Expression of human fetal brain antigens by human tumors of neuroectodermal origin as defined by monoclonal antibodies.  
Cancer Res. **42**, 267-275 (1982)

Wikstrand, C. J., Bigner, S. H., Bigner, D. D.: Demonstration of complex antigenic heterogeneity in a human glioma cell line and eight derived clones by specific monoclonal antibodies.  
Cancer Res. **43**, 3327-3334 (1983)

Wikstrand, C. J., Grahmann, F. C., McComb, R. D., Bigner, D. D.: Antigenic heterogeneity of human anaplastic gliomas and glioma-derived cell lines defined by monoclonal antibodies.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. **44**, 229-241 (1985)

Wikstrand, C. J., Mahaley, M. S., Bigner, D. D.: Surface antigenic characteristic of human glial brain tumor cells.  
Cancer Res. **37**, 4267-4275 (1977)

Woodruff, M. F. A.: Cellular heterogeneity in tumors.  
Br. J. Cancer **47**, 589-594 (1983)

Yeh, M. Y., Hellström, I., Hellström, K. E.: Clonal variation in expression of human melanoma antigen defined by a monoclonal antibody.  
J. Immunol. **126**, 1312-1317 (1981)

Yeh, M. J., Hellström, I., Brown, J. P., Warner, G. H., Hansen, J. A., Hellström, K. E.: Cell surface antigen of a human melanoma identified by monoclonal antibody.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **76**, 2927-2931 (1979)

Yung, W. A., Shapiro, J. R., Shapiro, W. R.: Heterogeneous chemosensitivities of subpopulations of human glioma cells in culture.  
Cancer Res. **42**, 992-998 (1982)

Zimmer, H. G.: Microphotometry.  
In: Neuhoff, V. (Ed.): Molecular biology, biochemistry and biophysics. Vol 14. Micromethods in molecular biology.  
Springer Verlag, Berlin/ Heidelberg/ New York, 1973

ANHANG

Tabelle 2: Zusammenstellung der mikrofluorometrischen Meßwerte der Anzahl immunreaktiver Zellen und deren durchschnittliche Fluoreszenzintensität einschließlich Streuung nach Darstellung der Bindungsreaktion monoklonaler Antikörper mit verschiedenen Gliomzelllinien mittels indirekter Immunfluoreszenzmethode.

| Lfd.Nr. | Datum | Tumor-<br>linie | Passage | Antikörper | nativ od.<br>fixiert<br>(Methanol/<br>Aceton) | gemessene<br>Anzahl<br>Felder | Erkennungsrate                  |                | Fluoreszenzintensität<br>(A.U.) |      |                     |
|---------|-------|-----------------|---------|------------|-----------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------|------|---------------------|
|         |       |                 |         |            |                                               |                               | Anzahl Zellen<br>gesamt positiv |                | $\bar{x}$                       | s    | $\frac{s}{\bar{x}}$ |
|         |       |                 |         |            |                                               |                               | n <sub>q</sub>                  | n <sub>p</sub> |                                 |      |                     |
| 1       | 1987  |                 |         |            |                                               |                               |                                 |                |                                 |      |                     |
| 2       | 26.0. | 85HG-59         | 176     | MUC 2-63   | nativ                                         | 16                            | 77                              | 54             | 19,3                            | 5,7  | 0,29                |
| 3       | 13.5. | "               | 170     | "          | "                                             | 23                            | 89                              | 41             | 10,6                            | 3,5  | 0,33                |
| 4       | 15.5. | "               | 170     | "          | fixiert                                       | 27                            | 94                              | 68             | 9,0                             | 4,0  | 0,44                |
| 5       | 20.0. | "               | 179     | "          | nativ                                         | 10                            | 91                              | 76             | 9,0                             | 2,9  | 0,32                |
| 6       | 26.0. | 85HG-63         | 200     | MUC 2-63   | nativ                                         | 11                            | 49                              | 49             | 49,3                            | 9,7  | 0,20                |
| 7       | 22.5. | "               | 200     | "          | fixiert                                       | 24                            | 173                             | 173            | 33,1                            | 7,7  | 0,23                |
| 8       | 15.5. | "               | 200     | MUC 8-22   | "                                             | 27                            | 173                             | 172            | 4,0                             | 1,5  | 0,31                |
| 9       | 25.5. | "               | 200     | WG/32      | nativ                                         | 14                            | 123                             | 120            | 7,7                             | 1,3  | 0,17                |
| 10      | 20.0. | "               | 207     | MUC 2-63   | fixiert                                       | 17                            | 90                              | 86             | 33,7                            | 7,0  | 0,21                |
| 11      | 26.0. | "               | 207     | MUC 8-22   | "                                             | 0                             | 59                              | 51             | 5,9                             | 1,6  | 0,27                |
| 12      | 10.0. | 85HG-64         | 460     | MUC 2-63   | nativ                                         | 23                            | 166                             | 132            | 15,1                            | 3,4  | 0,23                |
| 13      | 15.6. | "               | 460     | "          | fixiert                                       | 27                            | 175                             | 170            | 11,7                            | 2,4  | 0,21                |
| 14      | 19.0. | "               | 407     | "          | nativ                                         | 19                            | 103                             | 93             | 37,9                            | 7,4  | 0,20                |
| 15      | 19.0. | 85HG-65         | 337     | MUC 2-63   | nativ                                         | 10                            | 25                              | 19             | 36,1                            | 6,9  | 0,19                |
| 16      | 26.0. | "               | 337     | "          | "                                             | 11                            | 27                              | 25             | 37,3                            | 0,1  | 0,22                |
| 17      | 25.0. | "               | 337     | "          | fixiert                                       | 10                            | 70                              | 50             | 32,9                            | 7,9  | 0,24                |
| 18      | 21.0. | "               | 337     | WG/32      | nativ                                         | 20                            | 100                             | 77             | 34,4                            | 0,0  | 0,26                |
| 19      | 7.5.  | 85HG-66         | 193     | MUC 2-63   | nativ                                         | 19                            | 121                             | 77             | 26,5                            | 9,0  | 0,37                |
| 20      | 12.0. | "               | 193     | "          | "                                             | 22                            | 64                              | 51             | 29,5                            | 10,0 | 0,37                |
| 21      | 10.0. | "               | 193     | "          | "                                             | 14                            | 104                             | 59             | 31,7                            | 7,7  | 0,24                |
| 22      | 5.5.  | "               | 193     | MUC 8-22   | fixiert                                       | 13                            | 196                             | 130            | 7,7                             | 3,1  | 0,40                |
| 23      | 21.5. | 86HG-66-16      | 51      | MUC 2-63   | nativ                                         | 22                            | 148                             | 108            | 35,0                            | 11,1 | 0,32                |
| 24      | 25.5. | "               | 51      | "          | "                                             | 12                            | 94                              | 61             | 30,5                            | 13,4 | 0,44                |
| 25      | 14.0. | "               | 51      | "          | "                                             | 16                            | 114                             | 95             | 32,6                            | 5,4  | 0,16                |
| 26      | 21.5. | "               | 51      | MUC 8-22   | fixiert                                       | 11                            | 71                              | 59             | 7,5                             | 2,3  | 0,31                |
| 27      | 4.0.  | "               | 51      | "          | "                                             | 10                            | 179                             | 152            | 7,1                             | 2,6  | 0,37                |
| 28      | 26.0. | "               | 51      | "          | "                                             | 5                             | 32                              | 29             | 5,0                             | 1,3  | 0,25                |
| 29      | 12.0. | 86HG-39         | 22      | MUC 2-63   | nativ                                         | 10                            | 50                              | 47             | 26,9                            | 9,3  | 0,35                |
| 30      | 25.0. | "               | 28      | "          | "                                             | 8                             | 27                              | 27             | 29,4                            | 13,4 | 0,46                |
| 31      | 27.0. | "               | 28      | MUC 8-22   | fixiert                                       | 9                             | 65                              | 65             | 5,3                             | 0,9  | 0,17                |
| 32      | 21.0. | "               | 30      | MUC 2-63   | nativ                                         | 17                            | 61                              | 57             | 20,0                            | 0,9  | 0,45                |
| 33      | 19.0. | "               | 30      | "          | "                                             | 16                            | 101                             | 94             | 21,0                            | 5,9  | 0,27                |
| 34      | 17.0. | "               | 30      | "          | "                                             | 11                            | 69                              | 64             | 15,9                            | 3,7  | 0,23                |
| 35      | 17.0. | "               | 30      | "          | fixiert                                       | 13                            | 61                              | 59             | 17,5                            | 4,1  | 0,24                |
| 36      | 17.0. | "               | 30      | MUC 8-22   | "                                             | 15                            | 70                              | 67             | 4,9                             | 1,7  | 0,35                |
| 37      | 10.0. | "               | 30      | "          | "                                             | 14                            | 106                             | 91             | 5,0                             | 1,3  | 0,22                |
| 38      | 12.0. | "               | 30      | WG/32      | nativ                                         | 11                            | 42                              | 41             | 19,6                            | 4,5  | 0,23                |
| 39      | 21.0. | 87HG-20         | 2       | MUC 2-63   | nativ                                         | 10                            | 13                              | 13             | 50,9                            | 41,4 | 0,75                |
| 40      | 7.0.  | 87HG-29         | 3       | MUC 2-63   | fixiert                                       | 0                             | 22                              | 22             | 9,0                             | 2,4  | 0,27                |
| 41      | 18.0. | 87HG-30         | 5       | MUC 2-63   | nativ                                         | 11                            | 37                              | 27             | 16,4                            | 5,3  | 0,32                |
| 42      | 24.0. | "               | 5       | "          | "                                             | 11                            | 30                              | 20             | 32,9                            | 23,6 | 0,72                |
| 43      | 6.0.  | "               | 5       | MUC 8-22   | fixiert                                       | 9                             | 42                              | 42             | 5,2                             | 3,1  | 0,59                |
| 44      | 31.0. | 87HG-31         | 2       | MUC 2-63   | nativ                                         | 8                             | 94                              | 80             | 19,6                            | 5,3  | 0,27                |
| 45      | 20.0. | "               | 3       | "          | "                                             | 16                            | 101                             | 89             | 27,7                            | 5,4  | 0,04                |
| 46      | 4.0.  | "               | 3       | WG/32      | "                                             | 11                            | 126                             | 73             | 14,1                            | 4,4  | 0,31                |
| 47      | 7.0.  | "               | 6       | MUC 2-63   | "                                             | 8                             | 78                              | 78             | 20,1                            | 3,0  | 0,19                |
| 48      | 10.0. | "               | 6       | "          | "                                             | 23                            | 109                             | 96             | 24,1                            | 5,9  | 0,24                |
| 49      | 31.0. | "               | 12      | "          | "                                             | 5                             | 10                              | 10             | 30,6                            | 21,6 | 0,71                |
| 50      | 24.0. | "               | 12      | "          | "                                             | 11                            | 37                              | 33             | 35,0                            | 7,5  | 0,21                |
| 51      | 20.0. | "               | 12      | "          | fixiert                                       | 14                            | 39                              | 34             | 21,4                            | 4,4  | 0,21                |
| 52      | 21.0. | "               | 12      | WG/32      | nativ                                         | 12                            | 61                              | 54             | 9,6                             | 2,6  | 0,20                |
| 53      | 24.0. | 87HG-35         | 3       | MUC 2-63   | nativ                                         | 10                            | 69                              | 55             | 22,1                            | 5,6  | 0,25                |
| 54      | 27.0. | "               | 5       | "          | "                                             | 10                            | 20                              | 19             | 52,0                            | 22,9 | 0,44                |
| 55      | 26.0. | "               | 5       | MUC 8-22   | fixiert                                       | 14                            | 50                              | 54             | 11,0                            | 3,7  | 0,31                |
| 56      | 12.0. | 87HG-37         | 1       | MUC 2-63   | nativ                                         | 7                             | 15                              | 14             | 34,4                            | 20,3 | 0,59                |
| 57      | 24.0. | "               | 1       | "          | "                                             | 8                             | 10                              | 13             | 20,4                            | 16,5 | 0,81                |

1 = arithmetisches Mittel

2 = Standardabweichung

3 = Variationskoeffizient

Tabelle 3: Zweiseitiges Prüfverfahren der gemittelten Fluoreszenzintensitäten von Stichproben nach Student auf a) Kurz- und b) Langzeitvariationen.

| Testgruppen                        |         |                 |                                      |       |                               | Fluoreszenz-<br>intensitäten<br>der Stichproben |                |             |           | t - Test - Größen |               |                  |                     |
|------------------------------------|---------|-----------------|--------------------------------------|-------|-------------------------------|-------------------------------------------------|----------------|-------------|-----------|-------------------|---------------|------------------|---------------------|
| Gliom-<br>linie                    | Passage | Anti-<br>körper | Lfd.Nr. aus<br>Tabelle 2<br>zu Index |       | Anzahl<br>Scanning-<br>felder |                                                 | arithm. Mittel |             | Varianzen |                   | frei-<br>grad | berechn.<br>Wert | Tabellen-<br>wert   |
|                                    |         |                 | 1                                    | 2     | $n_1$                         | $n_2$                                           | $\bar{x}_1$    | $\bar{x}_2$ | $s_1^2$   | $s_2^2$           | f             | $t_b$            | $t_{\alpha=0,05}^f$ |
| 05HG-65<br>nativ                   | 337     | MUC2-63         | 14                                   | 15    | 10                            | 11                                              | 36,1           | 37,3        | 48        | 46                | 19            | 0,36             | 2,09                |
| 05HG-66<br>nativ                   | 138     | MUC2-63         | 19                                   | 20    | 22                            | 14                                              | 29,5           | 31,7        | 116       | 59                | 34            | 0,66             | 2,03                |
| 06HG-66-16<br>nativ                | 51      | MUC2-63         | 22                                   | 23    | 22                            | 12                                              | 35,0           | 30,5        | 123       | 179               | 32            | 1,05             | 2,04                |
| 06HG-66-16<br>fixiert <sup>a</sup> | 51      | MUC8-22         | 26                                   | 27    | 18                            | 5                                               | 7,1            | 5,0         | 6,8       | 1,7               | 21            | 1,72             | 2,08                |
| 06HG-39<br>nativ                   | 30      | MUC2-63         | 31                                   | 32    | 17                            | 16                                              | 20,0           | 21,8        | 79        | 35                | 31            | 0,68             | 2,04                |
| 06HG-39<br>nativ                   | 30      | MUC2-63         | 31/32                                | 33    | 33                            | 11                                              | 20,9           | 15,9        | 58        | 14                | 42            | 1,70             | 2,02                |
| 06HG-39 <sup>a</sup><br>fixiert    | 30      | MUC8-22         | 35                                   | 36    | 15                            | 14                                              | 4,9            | 5,8         | 2,9       | 1,7               | 27            | 1,59             | 2,05                |
| 07HG-31<br>nativ                   | 6       | MUC2-63         | 46                                   | 47    | 8                             | 23                                              | 20,1           | 24,1        | 14,4      | 35                | 29            | 1,78             | 2,05                |
| 07HG-31<br>nativ                   | 12      | MUC2-63         | 48                                   | 49    | 5                             | 11                                              | 30,6           | 35,8        | 467       | 26                | 14            | 0,78             | 2,14                |
| 07HG-37<br>nativ                   | 1       | MUC2-63         | 55                                   | 56    | 7                             | 8                                               | 34,4           | 20,4        | 412       | 272               | 13            | 1,47             | 2,16                |
| 05HG-66<br>nativ                   | 193     | MUC2-63         | 19/20                                | 18    | 36                            | 19                                              | 30,3           | 26,5        | 93        | 96                | 53            | 1,38             | 2,01                |
| 06HG-66-16<br>nativ                | 51      | MUC2-63         | 22/23                                | 24    | 34                            | 16                                              | 33,4           | 32,6        | 143       | 29                | 51            | 0,25             | 2,01                |
| 06HG-66-16<br>fixiert <sup>a</sup> | 51      | MUC8-22         | 25                                   | 26/27 | 11                            | 23                                              | 7,5            | 6,7         | 5,3       | 6,4               | 32            | 0,89             | 2,04                |

$t_{\alpha}^f$  = siehe Sachs, 1978, S.111

<sup>a</sup> = Methanol - Aceton (1/1)

Labelle 4 a : Reaktivität von drei monoklonalen Antikörpern mit fixierten und nativen Zellen verschiedener Gliomlinien dargestellt durch indirekte Immunfluoreszenztechnik.

| Tumor-Typ              | Tumor-Nr. Passage bzw. Tumor-linie |     | Antikörper        |     |                                  |     |                   |    |                                  |     |                |    |
|------------------------|------------------------------------|-----|-------------------|-----|----------------------------------|-----|-------------------|----|----------------------------------|-----|----------------|----|
|                        |                                    |     | MUC 2-63<br>nativ |     | MUC 2-63<br>fixiert <sup>a</sup> |     | MUC 8-22<br>nativ |    | MUC 8-22<br>fixiert <sup>a</sup> |     | W6/32<br>nativ |    |
|                        |                                    |     | W                 | ER  | W                                | ER  | W                 | ER | W                                | ER  | W              | ER |
|                        |                                    |     | n                 | %   | n                                | %   | n                 | %  | n                                | %   | n              | %  |
| Astrocytom II          | 85HG-63                            | 200 | 49                | 100 | 354                              | 100 |                   |    | 177                              | 96  | 123            | 98 |
| "                      | "                                  | 207 | 90                | 96  |                                  |     |                   |    | 111                              | 87  |                |    |
| "                      | 87HG-29                            | 3   | 53                | 98  | 22                               | 100 |                   |    |                                  |     |                |    |
| Astrocytom III         | 85HG-66                            | 193 | 485               | 64  |                                  |     |                   |    | 208                              | 67  |                |    |
| "                      | 86HG-66-16                         | 51  | 368               | 75  |                                  |     |                   |    | 387                              | 85  |                |    |
| "                      | 87HG-31                            | 2   | 94                | 85  |                                  |     |                   |    |                                  |     |                |    |
| "                      | "                                  | 3   | 101               | 88  |                                  |     |                   |    | 213                              | 82  | 126            | 58 |
| "                      | "                                  | 6   | 238               | 93  |                                  |     |                   |    |                                  |     |                |    |
| "                      | "                                  | 12  | 47                | 91  | 39                               | 87  |                   |    | 106                              | 94  | 61             | 89 |
| "                      | 87HG-35                            | 3   | 69                | 80  |                                  |     |                   |    | 108                              | 78  |                |    |
| "                      | "                                  | 5   | 105               | 96  |                                  |     |                   |    | 154                              | 75  |                |    |
| "                      | N36/B7                             | 0   | 148               | 21  | 17                               | 59  |                   |    |                                  |     |                |    |
| Oligodendro-<br>gliom  | 87HG-30                            | 5   | 67                | 70  |                                  |     |                   |    | 98                               | 78  |                |    |
| "                      | N39/B7                             | 0   | 124               | 19  |                                  |     |                   |    |                                  |     |                |    |
| Glioblastom            | 85HG-64                            | 468 | 450               | 92  | 175                              | 97  |                   |    |                                  |     |                |    |
| "                      | "                                  | 487 | 103               | 90  |                                  |     |                   |    | 107                              | 93  |                |    |
| "                      | 85HG-65                            | 337 | 52                | 85  | 78                               | 64  |                   |    | 430                              | 73  | 114            | 79 |
| "                      | "                                  | 352 |                   |     |                                  |     |                   |    | 95                               | 92  |                |    |
| "                      | 87HG-28                            | 2   | 13                | 100 |                                  |     |                   |    |                                  |     |                |    |
| "                      | 87HG-37                            | 1   | 33                | 82  |                                  |     |                   |    |                                  |     |                |    |
| "                      | 86HG-39                            | 22  | 50                | 94  |                                  |     |                   |    |                                  |     |                |    |
| "                      | "                                  | 28  | 27                | 100 |                                  |     |                   |    | 65                               | 100 |                |    |
| "                      | "                                  | 30  | 231               | 93  | 61                               | 97  |                   |    | 285                              | 93  | 42             | 98 |
| Glioblastom-<br>Sarcom | 85HG-59                            | 173 |                   |     |                                  |     |                   |    | 199                              | 85  |                |    |
| "                      | "                                  | 176 | 77                | 70  |                                  |     |                   |    |                                  |     |                |    |
| "                      | "                                  | 178 | 116               | 47  | 94                               | 73  | 102               | 25 |                                  |     |                |    |
| "                      | "                                  | 179 | 91                | 84  |                                  |     |                   |    |                                  |     |                |    |

ER = Erkennungsrate

n = Anzahl der beurteilten Zellen (Wichtung)

<sup>a</sup> = Methanol - Aceton (1/1)

labelle 4 b : Variabilität in der Erkennungsrate von monoklonalen Antikörpern  
in verschiedenen Präparationen einer Tumormlinie.

Darstellung von Mittelwerten mit Standardabweichung

| Lfd.Nr. | Tumormlinie | Passage | Antikörper | nativ/<br>fixiert | Präparat | immunreaktive Zellen |        |                    | Mittel-<br>wert<br>$\bar{x}$ | Standard-<br>abweichung<br>s |
|---------|-------------|---------|------------|-------------------|----------|----------------------|--------|--------------------|------------------------------|------------------------------|
|         |             |         |            |                   |          | Zellen<br>gesamt     | Anzahl | Prozent-<br>anteil |                              |                              |
| 1       | B5HG-59     | 173     | MUC 8-22   | fixiert           | 1        | 100                  | 82     | 82                 | 85                           | 4                            |
|         |             |         |            |                   | 2        | 99                   | 87     | 88                 |                              |                              |
| 2       | B5HG-63     | 200     | MUC 8-22   | fixiert           | 1        | 173                  | 172    | 99                 | 96                           | 4                            |
|         |             |         |            |                   | 2        | 104                  | 97     | 93                 |                              |                              |
| 3       | B5HG-64     | 460     | MUC 2-63   | nativ             | 1        | 146                  | 132    | 90                 | 92                           | 1,5                          |
|         |             |         |            |                   | 2        | 105                  | 98     | 93                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 3        | 106                  | 99     | 93                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 4        | 93                   | 85     | 91                 |                              |                              |
| 4       | B5HG-65     | 357     | MUC 8-22   | fixiert           | 1        | 120                  | 99     | 83                 | 73                           | 11                           |
|         |             |         |            |                   | 2        | 116                  | 93     | 80                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 3        | 100                  | 64     | 59                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 4        | 86                   | 59     | 69                 |                              |                              |
| 5       | B5HG-66     | 193     | MUC 2-63   | nativ             | 1        | 81                   | 41     | 51                 | 64                           | 12                           |
|         |             |         |            |                   | 2        | 121                  | 77     | 64                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 3        | 74                   | 57     | 77                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 4        | 64                   | 51     | 80                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 5        | 104                  | 59     | 57                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 6        | 41                   | 24     | 59                 |                              |                              |
| 6       | B6HG-66-T6  | 51      | MUC 2-63   | nativ             | 1        | 70                   | 61     | 87                 | 75                           | 9                            |
|         |             |         |            |                   | 2        | 94                   | 61     | 65                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 3        | 114                  | 95     | 83                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 4        | 106                  | 74     | 70                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 5        | 148                  | 108    | 73                 |                              |                              |
| 7       | B6HG-66-T6  | 51      | MUC 8-22   | fixiert           | 1        | 84                   | 67     | 80                 | 84                           | 3                            |
|         |             |         |            |                   | 2        | 179                  | 152    | 85                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 3        | 92                   | 79     | 86                 |                              |                              |
| 8       | B6HG-39     | 30      | MUC 2-63   | nativ             | 1        | 61                   | 57     | 93                 | 93                           | 0                            |
|         |             |         |            |                   | 2        | 101                  | 94     | 93                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 3        | 69                   | 64     | 93                 |                              |                              |
| 9       | B6HG-39     | 30      | MUC 8-22   | fixiert           | 1        | 70                   | 67     | 96                 | 93                           | 6                            |
|         |             |         |            |                   | 2        | 106                  | 91     | 86                 |                              |                              |
|         |             |         |            |                   | 3        | 109                  | 106    | 97                 |                              |                              |

Tabelle 5: Übersicht der Fluoreszenzintensität nach Bindungsreaktion von drei monoklonalen Antikörpern mit verschiedenen Gliomzelllinien.

| Tumor-Typ          | Tumor-linie | Passage | Antikörper         |                    |                                  |           |                                  |           |                   |           |
|--------------------|-------------|---------|--------------------|--------------------|----------------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|-------------------|-----------|
|                    |             |         | MUC 2-63<br>nativ  |                    | MUC 2-63<br>fixiert <sup>Δ</sup> |           | MUC 8-22<br>fixiert <sup>Δ</sup> |           | W6/32<br>nativ    |           |
|                    |             |         | $\bar{x}$<br>A.U.  | s<br>A.U.          | $\bar{x}$<br>A.U.                | s<br>A.U. | $\bar{x}$<br>A.U.                | s<br>A.U. | $\bar{x}$<br>A.U. | s<br>A.U. |
| Astrocvtom II      | 85HG-63     | 200     | 49,3               | 9,7                | 33,1                             | 7,7       | 4,8                              | 1,5       | 7,7               | 1,3       |
| "                  | "           | 207     |                    |                    | 33,7                             | 7,0       | 5,9                              | 1,6       |                   |           |
| "                  | 87HG-29     | 3       |                    |                    | 9,0                              | 2,4       |                                  |           |                   |           |
| Astrocvtom III     | 85HG-66     | 193     | 29,0 <sup>u</sup>  | 9,8                |                                  |           | 7,7 <sup>u</sup>                 | 3,1       |                   |           |
| "                  | 86HG-66-T6  | 51      | 33,2               | 10,3               |                                  |           | 7,0                              | 2,6       |                   |           |
| "                  | 87HG-31     | 2       | 19,6               | 5,3                |                                  |           |                                  |           | 14,1              | 4,4       |
| "                  | "           | 3       | 27,7 <sup>uu</sup> | 5,4                |                                  |           |                                  |           |                   |           |
| "                  | "           | 6       | 23,1 <sup>uu</sup> | 5,7                |                                  |           |                                  |           |                   |           |
| "                  | "           | 12      | 34,2               | 13,8               | 21,4                             | 4,4       |                                  |           | 9,6               | 2,6       |
| "                  | 87HG-35     | 3       | 22,1               | 5,6                |                                  |           |                                  |           |                   |           |
| "                  | "           | 5       | 52,0               | 22,9               |                                  |           | 11,8                             | 3,7       |                   |           |
| Oligodendro-gliom  | 87HG-30     | 5       | 24,7               | 18,0 <sup>uu</sup> |                                  |           | 5,2                              | 3,1       |                   |           |
| Glioblastom        | 85HG-64     | 460     | 15,1               | 3,4                | 11,7                             | 2,4       |                                  |           |                   |           |
| "                  | "           | 487     | 37,9 <sup>u</sup>  | 7,4                |                                  |           |                                  |           |                   |           |
| "                  | 85HG-65     | 337     | 35,7 <sup>uu</sup> | 6,0                | 32,9                             | 7,9       |                                  |           | 34,4              | 8,8       |
| "                  | 86HG-39     | 22      | 26,9               | 9,3                |                                  |           |                                  |           |                   |           |
| "                  | "           | 28      | 29,4 <sup>u</sup>  | 13,4               |                                  |           | 5,3 <sup>uu</sup>                | 0,9       |                   |           |
| "                  | "           | 30      | 19,8               | 7,6                | 17,5                             | 4,1       | 5,4 <sup>uu</sup>                | 1,6       | 19,6              | 4,5       |
| "                  | 87HG-28     | 2       | 54,9 <sup>uu</sup> | 41,4               |                                  |           |                                  |           |                   |           |
| "                  | 87HG-37     | 1       | 26,9               | 19,1               |                                  |           |                                  |           |                   |           |
| Glioblastom-Sarkom | 85HG-59     | 176     | 19,3               | 5,7                |                                  |           |                                  |           |                   |           |
| "                  | "           | 178     | 10,6               | 3,5                | 9,0                              | 4,0       |                                  |           |                   |           |
| "                  | "           | 179     | 9,0                | 2,9                |                                  |           |                                  |           |                   |           |

" = Mittelwert aus 3 Präparaten

" = Mittelwert aus 2 Präparaten

Δ = Methanol - Aceton (1/1)

Allen, die mir bei der Durchführung der Arbeit geholfen haben, danke ich sehr herzlich,  
Insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Dr. D. Stavrou für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte  
freundliche Unterstützung und kritische Beratung,

Herrn Dr. Th. Blitzer für die Anregung zu diesem Thema,

der Fa. Zelss, Insbesondere Herrn J. Famula für die mühevolle Einweisung in die Nutzung der ver-  
wendeten Meßsysteme,

Herrn Chefarzt Dr. E. Kelditsch, Institut für Pathologie des Krankenhauses München-Bogen-  
hausen, und seinen Mitarbeitern für die Überlassung des Materials und die Benutzung der  
Laboreinrichtung,

Frau B. Martin für die kollegiale Unterstützung,

Frau D. Wallmann für die tatkräftige Hilfe im Labor und

Herrn Dipl.-Ing. U. Winkler, der mir in Fragen der elektronischen Datenverarbeitung von großer  
Hilfe war.

## Lebenslauf

|                   |                                                                                                                                                                     |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5.2. 1961         | geboren in Glückstadt als Tochter von<br>Dipl. Chem. Dr. Anneus Groeneveld und<br>Ingrid Groeneveld, geb. Jonas                                                     |
| 1967              | Einschulung in die Grundschule Glückstadt                                                                                                                           |
| 1971              | Übergang zum Dellefsen-Gymnasium Glückstadt                                                                                                                         |
| 1977              | Besuch der Oberstufe des Kaiser-Karl-<br>Gymnasiums in Itzehoe                                                                                                      |
| 1980              | Abitur                                                                                                                                                              |
| 1980              | Studium der Veterinärmedizin an der<br>Tierärztlichen Hochschule Hannover                                                                                           |
| Nov. 1985         | Tierärztliche Prüfung in Hannover                                                                                                                                   |
| seit<br>Jan. 1986 | Bearbeitung eines Dissertationsthemas an<br>der Abteilung für funktionelle Pathologie<br>der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-<br>Maximilians-Universität München |
| 7.2. 1986         | Approbation                                                                                                                                                         |





